

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658021

研究課題名(和文)ルーピンのクラスター根における根粒菌感染過程の解明と新たな根粒菌接種法の開発

研究課題名(英文) Study on rhizobial infection to the cluster roots of Lupinus species and its application to the inoculation practices

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(系)・教授

研究者番号：50236783

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)：ルーピンは、低リン条件ではクラスター根を形成してリンを獲得するので肥沃度の向上に寄与する。本研究では、異なるリン条件下でのクラスター根の形成、有機酸の滲出、根粒形成の種間差異を明らかにした。旧世界型の白花ルーピンは低リン条件でクラスター根を形成したが、南米原産のパールルーピンは形成しなかった。滲出した有機酸は、クエン酸とリンゴ酸が主であった。根粒からは、Bradyrhizobium, Rhizobium, Pseudomonasが単離された。ルテオリンは根粒菌の増殖を促進しなかった。これらの菌系統に発色標識遺伝子を導入できたので、クラスター根への感染様態について研究を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Lupinus species are temperate legume showing positive effects on soil fertility due to the specific root growth under low P condition. The genus Lupinus includes 300 species spread over the world. We investigated the interspecific differences in cluster root formation, exudation of carboxylates, and root nodule formation among these species. Some species from the Old and New World were compared to understand the adaptation to low P. *L. mutabilis*, which is originated from South America, did not produce the cluster root, but *L. albus* from the Mediterranean area showed it. Carboxylates exuded from roots were mainly citrate and malate. Several bacterial isolates from root nodules were clarified to *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, and *Pseudomonas*. Luteolin was not effective for bacteria proliferation. To define the infection process of the bacteria, a *gusA*-marker gene was transferred to the isolates. The further research on rhizobial infection to the cluster root is now in progress.

研究分野：作物生産科学

キーワード：飼料作物 窒素固定 根系発育 地力増強 フラボノイド 根粒 リン酸

## 1. 研究開始当初の背景

食用、飼料用、緑肥用などに利用されるマメ科植物のルーピン (*Lupinus* 属) は、旧世界型と新世界型に分類され約 300 の記載種がある。子実の高タンパク (40-50%)、高脂質 (15-25%)、耐塩性、耐湿性、耐酸性、低温耐性、低リン耐性、重金属耐性に優れ、疲弊しつつある農耕地で必要な多くの特性を持つ。旧世界型は欧州と北米、新世界型は南米とオーストラリアで栽培面積を増やしている (Pascuel *et al.*, 2007)。日本でも北海道の普通畑や転換畑でリン吸収特性や耐湿性が着目されている。本属植物が注目されたのは、リン欠乏条件下での適応戦略であるクラスター根の形成と有機酸や酸性フォスファターゼの分泌によるリンの獲得機能が明らかにされてからである。その後、根粒菌の *Bradyrhizobium* 以外に、*Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005) や *Ochrobacterium* (Trujillo *et al.*, 2005) が根粒を形成すること、難溶性無機リンやフィチンの溶解活性をもつ微生物が根圏から単離されたこと (Weisskopf *et al.*, 2011)、さらにマメ科の中でも例外的にアーバスキュラー菌根 (AM) 菌が感染しない原因として根が産生するピラノイソフラボンにより菌糸伸長が阻害されること (Akiyama *et al.*, 2010) などが報告され、その形質が明らかにされつつある。しかし、本属植物の重要な特性である低リン条件下で著しく変動する根系構造とその根における共生根粒菌の感染過程については、依然として不明な点が多く、地力増強に本属植物とその根粒菌共生系を有効に活用する上に解明すべき点が多いことから本研究を遂行することとした。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、マメ科作物のリン獲得戦略の多様性に関する研究 (基盤研究 (A) H20-22 年度) の中で、*L. luteus* から難溶性無機リンと有機態リンであるフィチンの溶解活性をもつ根粒菌を単離した (松村ら 2010)。しかし、低リン環境に応答した本属植物のクラスター根形成が、多様な根圏微生物の一つでもある根粒菌の感染動態にいかに関与しているかについては明らかにできなかった。この点を解明することは、根の構造変化とその根圏におけるリン溶解性根粒菌の双方によるリンと窒素の栄養獲得機能を明らかにするといったこれまでにない視点であり、劣化した土壌環境に適応する本属植物の特性を理解する基盤となり、多様な土壌環境への導入や品種育成にとって有用な知見となる。そこで、本研究では、まず、ルーピンのリン欠乏条件下での根の形態変化と根粒形成との関係を解析するための基礎的知見を得るため、栽培種である白花ルーピン (*L. albus*)、青花ルーピン (*L. angustifolius*)、黄花ルーピン (*L. luteus*)、パールルーピン (*L. mutabilis*) の 4 種を供試し、リン欠乏が根

系発育に及ぼす影響について明らかにすることとした。また、今後の研究を進める上に基盤となる根系発育と根粒着生の様態を観察するための実験手法の開発を提案し、さらに、これらの手法を利用して、リン可溶性に機能する根からの有機酸分泌と根系発育の特性について検討することとした。特に先行研究の少ない南米原産のパールルーピンについては、異なるリン条件下において根から分泌される有機酸を定量し、これまでに研究成果が多い白花ルーピンとの異同について明らかにすることを目的とした。また、今後の研究に資するために、単離した根粒菌の属の同定と相互類縁関係の解析により、感染根粒菌の異同を明らかにすることとした。さらに、根粒菌の感染時に機能するイソフラボノイドの一種であるルテオリンが、根粒菌の増殖に及ぼす影響を明らかにし、劣悪環境下での根粒菌感染の制御に利用できないかについても検討を進めることとした。すなわち、*nod* 遺伝子の転写活性を予め高めるためのイソフラボノイドによる根粒菌の前培養法を検討し、リン溶解活性をもつ根粒菌が土着根粒菌に優先して感染し得る接種法の開発に資することとした。また根粒菌の感染と感染後の皮層細胞の分裂、初期の根粒構造の形成の様相を詳細に解明するために、発色マーカー遺伝子の  $\beta$ -グルクロニダーゼ (*gusA*) 遺伝子をルーピンの根粒菌に導入して、*gusA* 標識菌株を作出することを試みた。以上の視点から、萌芽的研究として関連する知見を集積することを目的に 3 年間の研究に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物材料

白花ルーピン (*Lupinus albus*) 19 系統、黄花ルーピン (*Lupinus luteus*) 10 系統、青花ルーピン (*Lupinus angustifolius*) 3 系統、パールルーピン (*Lupinus mutabilis*) 3 系統について、北海道農業研究センターから分譲して頂いた。各系統を大阪府立大学生命環境科学域附属教育研究フィールド内圃場 (大阪府堺市中央区<灰色低地土の畑圃場>) で採種の可否を確認した上で、系統保存できた数系統について、以下の研究に適宜供試した。

### (2) クラスター根形成の種間差異

白花ルーピン LP 139 系統、黄花ルーピン LP 67 系統、青花ルーピン LP 38 系統、パールルーピン LP 175 系統を供試して試験を行った。表面殺菌した種子を予め滅菌した川砂を充填した育苗用バットに置床した。得られた実生を以下のような水耕装置に移植して栽培し、クラスター根の形成について調査した。水耕装置として、小型プランターの上部に、直径 2 cm の穴を 5 つあけたスポンジゴムを設置し、エアレーション用のチューブを挿入した。なお、空気量は適宜調整し 24 時間連続で供給した。各実生の下胚軸に脱脂綿を巻き、スポンジゴムの穴に移植した。

培養液にリン ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) を 34 mg/L の濃度

で添加した+P区と、無添加の-P区の2処理区を設けた。移植後4日間は、両処理区ともに+P区の濃度を1/2に減じた培養液で栽培し、5日目に培養液を上記のものと交換し、その後は3日ごとに新たな培養液に交換した。培養液のpHは6.0に調整し、その変化を毎日測定した。生育の程度が系統によって異なっていたので、白花ルーピンは移植4週目、黄花ルーピンと青花ルーピンは6週目、パールルーピンは8週目にクラスター根の発生部位数を調査し、主茎長、主茎節数、地下部と地上部の乾物重を測定した。根系構造の解析のためにWinRHIZOソフトウエアを用いて根の太さ別の根長を測定した。採取した植物体は粉末試料とし、乾式灰化-硫酸抽出法で全リンを抽出し、モリブデンイエロー法で全リン含有率を測定した。

### (3) 根系発育と根粒着生の観察のための実験系の構築

#### ① 試験管を用いた方法

表面殺菌した白花ルーピン (LP139 系統) の種皮を除去し、プラントボックスに分注した0.8%寒天培地に種子を置床した。発芽後、OD<sub>620</sub> 値を0.2に調整したU1103 LA 1-3 系統 (後述) の根粒菌懸濁液に1時間浸漬した。切り込みを入れたシリコ栓を実生の下胚軸基部にはめ込み、試験管 (30×200 mm) 内に培養液を分注し、実生をはめ込んだシリコ栓を取り付けた。培養液のリン濃度等の処理については上記と同じとした。主茎長、主茎節数、根粒形成の様態とクラスター根発生部位数を7日毎に調査した。

#### ② グロースポーチを用いた方法

上記の試験管を用いた方法と同様に、白花ルーピン (LP139 系統) の実生を準備し、培養液で内部の紙を湿らせたグロースポーチに移植した。U1103 LA 1-3 系統 (後述) の根粒菌懸濁液を株元に接種した。処理区と栽培方法は、試験管を用いた方法と同様とした。

#### ③ 寒天斜面培地を用いた方法

上記と同様に、白花ルーピン (LP139 系統) の実生を準備し、寒天培地を試験管に分注した斜面培地に移植し、根粒菌を接種して生育させた。

#### (4) 根からの有機酸の滲出

表面殺菌したパールルーピン (LP176 系統) と白花ルーピン (LP139 系統) の種子を赤玉土とバーミキュライトを混合した滅菌培土を充填したロングポットに播種した。第2葉展開時までは上水を適宜与えて生育させ、その後 Keerthisinghe (1998) の培養液を施用した。培養液にリン (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を0.14 mg/L の濃度で添加したP<sub>1</sub>区、6.80 mg/L の濃度で添加したP<sub>50</sub>区、13.61 mg/L の濃度で添加したP<sub>100</sub>区、34.02 mg/L の濃度で添加したP<sub>250</sub>区の4処理区を設けた。第2葉展開後4日間は、4処理区ともにP<sub>1</sub>区のリン濃度を1/2に減じた培養液で栽培し、5日目に培養液を上記のものに切り替えて、その後は生育に応じて施用量と施用回数を調整した。処理開始10

日目と20日目にサンプリングし、根からの分泌物を収集して有機酸滲出量を定量するとともに、主茎長、主茎節数、クラスター根の発生部位数、根粒数、乾物重を測定し、全リン含有率を求めた。根の分泌物の回収については、ポットから根を取り出し、土壌を丁寧に洗い落とした後、100 mL の超純水を入れた200 mL 容フラスコにエアポンプで空気を適宜供給しながら2時間浸漬することで行った。滲出液は濾過し、ガスクロマトグラフィー質量分析計で有機酸を分析した。

#### (5) 単離細菌の属の同定

クラスター根における根粒形成の実験に供試する根粒菌を得るために、*Lupinus* 属各種に感染する根粒菌の単離を行った。先ず、上記の水耕栽培実験においてパールルーピンに形成された根粒から単離を試みた。すなわち、水耕栽培で確認された根粒を採取し、常法により1/10濃度のYM寒天培地に画線培養した。出現したコロニーをYM寒天培地で継代培養し、本菌株をU1101 LM系統とした。一方、前述した試験圃場で栽培した白花ルーピンと青花ルーピンから、上記と同様の方法でそれぞれ根粒菌を単離し、白花ルーピンからはU1103LA 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5の5系統、青花ルーピンからはU1103LAF 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 2-3の5系統をそれぞれ得た。単離した各系統の属の同定には、16S rRNA 遺伝子、*nodD* 遺伝子、*nifD* 遺伝子の塩基配列を用い、コロニーPCRによって目的遺伝子を直接増幅して供した。常法によりシーケンス用PCR産物を調整し、塩基配列を解析した。比較菌株として *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. yuanmingense*, *B. sp.*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. sp.*, *Mesorhizobium loti*, *M. sp.*, *Sinorhizobium meliloti* の各系統を供試した。

#### (6) ルテオリンが根粒菌増殖に及ぼす影響

YM液体培地に根粒形成を誘導するルテオリンを0, 0.05, 0.5, 5, 20, 40 μMの濃度で添加した。予め培養したGP1系統の単コロニーを白金耳で掻きとって各濃度のルテオリンを含有するYM液体培地に懸濁して振とう培養した。OD値620 nmの吸光度で菌密度を経時的に計測した。なお、OD値は24時間毎に14~26日間継続して測定した。

#### (7) 根粒菌への *gusA* 遺伝子の導入

根粒菌の根面での挙動を観察するために、発色標識遺伝子であるβ-グルクロニダーゼ (*gusA*) 遺伝子 (Wilson *et al.* 1995) の根粒菌への導入を試みた。*gusA* 遺伝子導入には、大腸菌のS17-1-λ *pir* 系統にクローニングされたpCAM121 (mTn5SS*gusA*21を保有) を用い、接合伝達法によって導入を試みた。選択培地にX-glcAを添加し、穿孔接種した後、27°Cで3~7日間培養し、青発色の有無で形質転換の有無を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) クラスター根形成の種間差異

白花ルーピンでは、地上部と地下部の乾物重は、-P 区と+P 区との間で有意な差異が認められなかったが、黄花ルーピンでは、地下部乾物重が-P 区で有意に増加し、青花ルーピンとパールルーピンでは、-P 区で地上部の乾物重が有意に減少した。特にパールルーピンでは、他の3種と比較して両区の差が著しく大きかった。地上部の生育は、白花ルーピンと黄花ルーピンでは、-P 区と+P 区間の差異は明確ではなく、青花ルーピンとパールルーピンでは、-P 区が+P 区に比べて明らかに劣り、その傾向は特にパールルーピンで顕著であった。白花ルーピンと黄花ルーピンでは、-P 区でクラスター根が形成されたが、青花ルーピンとパールルーピンでは形成されなかった。全リン含有量はいずれの種でも、-P 区で+P 区より有意に減少した。地上部、地下部別に両区間の全リン含有量の差異をみると、白花ルーピンと黄花ルーピンと青花ルーピンでは、+P 区に対する-P 区の減少割合に差異はみられなかったが、パールルーピンでは、地下部における差異よりも地上部における差異が著しく大きかった。以上のように、パールルーピンは、供試した他の種に比べてリン欠乏条件下での生育抑制が大きいことが示された。

白花ルーピンと黄花ルーピンにおけるクラスター根数は、白花ルーピンでは個体当たり9.4個、黄花ルーピンでは5.8個であった。なお、白花ルーピンでは6日目に、黄花ルーピンでは15日に、クラスター根の形成が肉眼で確認できた。白花ルーピンのクラスター根は、短い小根が密に発生するタイプであったが、黄花ルーピンでは、長めの小根が白花ルーピンほど密生せずに発生した。白花ルーピンと黄花ルーピンでは、-P 区で+P 区よりも総根長が増加する傾向があり、青花ルーピンとパールルーピンでは、-P 区で減少する傾向が認められた。根の太さ別の根長について、直径0~0.6 mmの細い根と0.6~1.2 mmの中程度の根、1.2 mm以上の太い根の3つに分級して解析したところ、白花ルーピンと黄花ルーピンでは、+P 区に比べて-P 区において、



図 Lupinus 属4種の根系と根粒  
左から *L. albus*, *L. luteus*,  
*L. angustifolius*, *L. mutabilis*

どの太さの根も増加したが、青花ルーピンでは、中程度の太さの根だけが増加し、その他の根は減少した。一方、パールルーピンでは、-P 区でどの太さの根も減少した。

##### (2) 根系発育と根粒着生の観察のための実験系の構築

###### ① 試験管を用いた方法

根粒菌接種17日後に-P 区の1個体で根粒が形成され、38日目には+P 区で10個体中6個体、-P 区で10個体中2個体で形成されるにとどまった。-P 区では根の褐変が著しかった。培養液のpHは両区ともに減少する傾向があり、減少程度は-P 区で大きかった。

###### ② グロースポーチを用いた方法

根粒菌接種20日後に-P 区の2個体で根粒が形成された。29日目に調査を打ち切ったが、その時点では+P 区で4個体中2個体、-P 区で4個体中2個体に根粒が形成された。培養液のpHは減少する傾向にあった。

###### ③ 寒天斜面培地を用いた方法

根粒菌接種9日後に根粒が形成された。本実験ではN施用の効果を予備的に調査したが、13日目に、+N 区で10個体中7個体、-N 区で10個体中7個体にそれぞれ根粒が形成された。寒天斜面培地は培地の乾燥が著しく、移植後1週間ほどで培地に亀裂が生じ、4週目で乾燥が著しく、根粒が十分に肥大しなかったが、根粒と根系の観察は容易であった。

##### (3) 根からの有機酸の滲出

###### ① クラスター根形成と生育およびリン吸収

クラスター根は、白花ルーピンの全てのリン酸濃度区において形成されたが、パールルーピンでは形成されなかった。白花ルーピンでは、地上部乾物重にはリン濃度区間で差が見られなかったが、地下部では1 μM 区で50, 100 μM 区より有意に小さかった。パールルーピンでは、リン濃度区間による差異は見られなかった。全リン含有量については、白花ルーピンでは、処理開始後10日目には、地上部では1 μM 区で50 μM 区より、地下部では1 μM 区で100 μM 区より有意に小さかったが、処理開始後20日目にかけてはリン吸収量の増大はほとんど認められず、いずれのリン濃度処理区間においても差は見られなかった。一方、パールルーピンでは、処理開始後10日目には、地上部では250 μM 区で1, 50, 100 μM 区より有意に大きかった。20日目にかけての増大程度は、白花ルーピンに比べて著しく多かったが、いずれのリン濃度区間においてもほぼ同様の値を示し、区間での有意な差異はなかった。リン1g当たりの乾物生産量(リン利用効率)を両種間で比較すると、処理開始後10日目では、白花ルーピンがリン1gあたり220~260 mgの乾物生産量であったのに対して、パールルーピンでは、340~400 mgとやや高いことが示された。

###### ② 有機酸の滲出

根から滲出された有機酸は、白花ルーピン、パールルーピンのいずれでも主にクエン酸とリンゴ酸であり、他にフマル酸、コハク酸、

マロン酸, シュウ酸が検出された. 滲出された有機酸総量を種間で比較すると, 処理開始後 10 日目において, 50  $\mu\text{M}$  区と 250  $\mu\text{M}$  区では, パールルーピンが白花ルーピンよりも有意に多かった. また, 20 日目においては, 1  $\mu\text{M}$  区と 50  $\mu\text{M}$  区では, パールルーピンが白花ルーピンよりも有意に多かった. なお, いずれのサンプリング日においても, パールルーピンにおいて滲出される有機酸総量が白花ルーピンよりも多い傾向にあった. 滲出量が多かったクエン酸とリンゴ酸についてそれぞれ種別に比較した. クエン酸については, 10 日目には, リンゴ酸と同様にいずれのリン濃度区においてもパールルーピンが多い傾向を示し, 50  $\mu\text{M}$  区と 250  $\mu\text{M}$  区においては有意な差異が認められた. また, 20 日目には, リンゴ酸とは異なり, いずれのリン濃度区においても, パールルーピンが白花ルーピンよりも有意に多かった.

滲出した有機酸総量に占める各有機酸の割合については, 処理開始後 10 日目には, 両種ともにリン濃度が 250  $\mu\text{M}$  から 1  $\mu\text{M}$  へと低くなるにつれてクエン酸の割合が顕著に増加した. 種別に見ると, 白花ルーピンでは, リンゴ酸の割合にはリン濃度処理区による差異はみられなかったが, パールルーピンでは, クエン酸の割合が増加するにつれてリンゴ酸の割合が減少した.

両種ともに地上部全リン含有率の増大と地上部乾物重との間に負の相関がある傾向にあった. また, 根から滲出された有機酸総量と地上部の全リン含有率の相関関係を見ると, 地上部の全リン含有率が小さくなると, 根から分泌される有機酸総量が多くなる傾向が見られた.

#### (4) 単離細菌の属の同定

16S rRNA 遺伝子については, 供試した全ての根粒菌で増幅したバンドが確認できたが, *nodD* 遺伝子と *nifD* 遺伝子については, U1103LA 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 系統 (以下「U1103LA 系統」と略記) のみで確認された. 従って, U1101LM 系統および U1103LAF 1-1, 1-2, 2-2, 2-3 系統 (以下「U1103LAF 系統」と略記) の計 5 系統については, 本実験で用いた *nodD* 遺伝子と *nifD* 遺伝子のプライマーでは属の同定を行うことができなかった. 一方, 16S rRNA 遺伝子を用いた解析の結果, U1101LM 系統は *Rhizobium* 属, U1103LA 系統は *Bradyrhizobium* 属, U1103LAF 系統は *Pseudomonas* 属であることが示された. 16S rRNA 遺伝子について系統樹を作成すると, U1103LAF 系統 (*Pseudomonas* 属) のみのクラスターと, 根粒菌 15 系統で構成されたクラスターの 2 つに大きく分岐し, 根粒菌で構成されたクラスターは, さらに *Bradyrhizobium* 属 9 系統とそれ以外の属の 6 系統で分岐した. U1103LA 系統, *Bradyrhizobium* の標準菌株として用いられる *B. japonicum* USDA110 系統および *B. sp* 系統間では 100% の相同性が確認された. U1103LA 系統と *B. elkanii* 系統,

*B. yuanmingense* 系統間では相同性が約 99% と高かった. また, U1101LM 系統は *R. sp.* 系統とは 97.1%, *R. leguminosarum* 2 系統とは 93.6% の相同性を示した.

本実験では, 詳細な系統間の異同について提示するデータは得られなかったが, 16S rRNA 遺伝子の解析によって, 旧世界型である白花ルーピンの根粒菌は *Bradyrhizobium* 属, 新世界型であるパールルーピンの根粒菌は *Rhizobium* 属であることが示された. すなわち, 少なくとも, 本研究で単離した根粒菌を解析した限りでは, 両種には異なる属の根粒菌が感染することが明らかとなった. また, 旧世界型である青花ルーピンの根粒から単離された U1103LAF 系統は, 本種の根に形成された根粒から単離したものであったが, 16S rRNA 遺伝子解析の結果, *Pseudomonas* 属であった. *Pseudomonas* 属細菌の中には, 植物の生育を促進する植物生育促進根圏細菌 (PGPR) と呼ばれるものが含まれる. 多くの PGPR は, インドール-3-酢酸 (IAA) を産生することが知られている. *Pseudomonas* spp. を *Rhizobium* spp. と共接種することで, アルファルファ, ラッカセイ, ダイズのような様々なマメ科作物において, 根粒形成や窒素固定, 植物バイオマス, 穀物収量が増加したという報告もあり, *Pseudomonas* 属菌が産生する IAA が青花ルーピンの根の細胞分裂を促進し, 根粒様構造を形成させることや共感染が生育に何らかの影響を及ぼす可能性も考えられ, 本植物における *Pseudomonas* 属菌の感染様態とその機能解析についての今後の展開に興味もたれる.

#### (5) ルテオリンが根粒菌増殖に及ぼす影響

培養初期から添加濃度が高い区で OD 値はやや低い値となり, 5 日目以降 5, 20, 40  $\mu\text{M}$  区において低く推移し, 7 日目以降, 0.05, 0.5  $\mu\text{M}$  区においても無添加区に比べてやや劣る傾向を示した. 根粒菌接種に利用する際に増殖程度の大凡の目安として用いる OD 値が 1.0 に達するのに要した日数は, 無添加区では 13 日であったのに対し, ルテオリンを添加した区では 16~21 日と大幅に遅れ, ルテオリンが増殖をやや阻害する可能性が示された. 現在, 異なるイソフラボノイドによる前処理が根粒菌の増殖と感染の早晚に及ぼす影響について検討中である.

本実験で, ルテオリンに抗菌作用があることが示唆されたことから, ルーピンの根面では根粒菌の増殖が抑えられ, 根粒菌が感染しにくいとも考えられる. ルーピンの根からはフラボノイドの他にアルドン酸が分泌されると報告されており, エリスロニック酸やテトロニック酸といったアルドン酸がフラボノイドと組み合わせることで, 根粒菌の *nod* 遺伝子の転写を誘導したとの報告もある. 今後, リン欠乏条件下でのこの現象を明確にすることに興味もたれる. また, その際に培地中のリン濃度とルーピン根系の形態変化について検討することを視野に入りたい.

#### (6) 根粒菌への *gusA* 遺伝子の導入

導入に先立ち、供試した根粒菌各菌株 (GP1~5 系統, U1101LM 系統) の抗生物質抵抗性について調査したところ, GP1 と GP5 系統はスペクチノマイシン (Sp) およびストレプトマイシン (St) を混合して添加すると増殖は認められなかったことから, pCAM121 に組み込んだ *gusA* 遺伝子を導入する際に本プラスミドの利用が可能であった. 一方, U1101LM 系統は Sp に対しては抵抗性を有したが, St では選抜が可能であった. 供試した根粒菌各菌株の好適炭素源には差異があることが認められたので, 接合伝達に用いる BD-minimal 培地への炭素源として, GP1 系統ではマンノースを, U1101LM 系統ではグルコースをそれぞれ用いることとした. これらの実験条件を決定した上で, 接合伝達実験を行ったところ, 選抜したコロニーを X-glc を添加した培地に穿孔接種すると, 何れも青く発色し, 両系統において *gusA* 遺伝子を導入することができた. しかし, 試験期間内に, 当初の目的としたクラスター根における感染様態については, 明確な結論を得ることができず, 現在接種試験について鋭意遂行中である. 特に, 上述した種々の根系発育を観察する実験系ならびにその際の培養液中のリン濃度と有機酸放出との関係に関する知見を集積できたことから, 本ツールを利用して異なる根系発育を呈する種々の条件下で, 根粒菌がどのように感染するかについての知見が得られるものと期待している.

#### <引用文献>

- Keerthisinghe *et al.*, 1998. *Plant, Cell Environ.* 21: 467-478.  
松村ら, 2010. *根の研究* 19:62.  
Pascuel *et al.*, 2007. *Dyn. Soil Dyn. Plant* 1:1-16.  
Trujillo *et al.*, 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1318-1327.  
Valverde *et al.*, 2005. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1985-1989.  
Wilson *et al.* 1995. *Microbiology.* 141(7): 1691-1705.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Funakoshi, Y., Daimon, H. and Matsumura, A. 2015. Formation of densely branched lateral roots in *Sesbania cannabina* triggered by patchily distributed phosphorus in andosolic soils. *Plant Root* 9: 24-34. (査読有)  
<http://www.plantroot.org/TOC2014-1.html>
- ② 大門弘幸 2014. 植物における根の形態と機能の科学. *機能材料* 34: 55-57 (査読無)  
[http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product\\_id=4762](http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=4762)
- ③ Tarui, A., Matsumura, A., Asakura, S., Yamawaki, K., Hattori, R. and Daimon, H.

2013. Enhancement of nitrogen uptake in oat by cutting hairy vetch grown as an associated crop. *Plant Root* 7: 83-91. (査読有)

[http://www.plantroot.org/PDFarchive/2013/7\\_83.pdf](http://www.plantroot.org/PDFarchive/2013/7_83.pdf)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Daimon, H. Improving legume productivity under suboptimal environmental conditions. Conference of Asian Pacific Chemical, Biological, Environmental Engineering Sciences. (三井ガーデンホテル 京都三条<京都市>). 2015年4月7日 (招待講演)
- ② 船越有里, 大門弘幸, 松村篤 黒ボク土におけるリン酸施用が *Sesbania cannabina* の根系構造に及ぼす影響. 第38回根研究集会 (ホテルニュー種子島<西之表市>). 2013年5月17日
- ③ 江川明日香, 松村 篤, 静川幸明, 居原 秀, 和田野 晃, 大門弘幸 *Lupinus* 属植物4種の低リン条件に対する応答反応. 第37回根研究集会 (京都大学理学部<京都市>). 2012年12月2日
- ④ Nakamura, S., Matsumura, A., and Daimon, H. Morphological changes in roots of *Pisum sativum* L. inoculated with preincubated rhizobia with naringenin. The 6th International Crop Science Congress (ペントゴンザルベス<ブラジル>) 2012年8月8日

[その他]

ホームページ等

<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・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 50236783

##### (2) 研究分担者

松村 篤 (MATSUMURA Atsushi)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号: 30463269

居原 秀 (IHARA Hideshi)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号: 60254447