

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850008

研究課題名(和文)リン獲得に関与する特殊根の形態機能解析とその応用へ向けた基盤研究

研究課題名(英文) Morphological and physiological studies on densely branched lateral roots triggered by soil phosphate

研究代表者

松村 篤 (Matsumura, Atsushi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：30463269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低リン耐性を有するとされるマメ科作物の *Sesbania cannabina* を中心にして低リン条件に対する適応反応を根系形態から評価した。黒ボク土のようにリン酸吸収係数が高い土壌において低リン状態に陥った *S. cannabina* は、土壌中で局所的に存在するリンに対して高次に側根が発達した根(特殊根)の形成によってリンを獲得していることが明らかとなった。また、特殊根は同根系内の他の根と比較して低リン時の酸性ホスファターゼ活性が低く、リンの吸収を補助するアーバスキュラー菌根菌との共生程度も異なるなど生理学的にも異なる性質を有すること示された。

研究成果の概要(英文)：Densely branched lateral roots (DBLRs) in *Sesbania cannabina* are formed in response to patchily distributed phosphorus (P). DBLR formation is one of the P-acquisition strategies of *S. cannabina*. DBLRs were produced with secondary to quaternary lateral roots after primary roots passed near P fertilizer. Pi content per DBLR increased as DBLRs develop, resulting in higher shoot growth. Under P-deficient conditions, the activity of PEPC and APase increased in non-DBLR roots, but these activities were significantly lower in DBLRs in the same plants. AMF inoculation changed the root system architecture by significantly decreasing the numbers of DBLRs and AMF colonization was lower in DBLR formation compared to normal roots. Our results indicate that DBLR formation is one of the P-coacquisition strategies of *S. cannabina*. The traits of roots that form DBLR are clearly different in morphological, biochemical response and AMF symbiosis from non-DBLR roots.

研究分野：作物学

キーワード：リン酸獲得 低リン応答反応 根系構造 セスバニア 土壌微生物

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、リン欠乏条件下においてマメ科作物のセスバニアカンナビーナがヤマモガシ科の一部の植物や白花ルーピンが低リンに対する適応戦略として形成するクラスター根と形態的に類似した特徴的な根 (Densely Branched Root: DBR) を発達させ、その根が土壤中のリン酸獲得に寄与することを明らかにした。DBR の特徴として、リン酸が存在する付近での急激な側根の分岐、根毛の著しい発達などが挙げられる。最終的に DBR はリンを含む土壌を包み込み、根系に房状の根の塊が形成される。リン肥料の原料であるリン資源の枯渇問題によって今後世界的にリン争奪が激しさを増すと予想される中、国内外でリン酸の効率的吸収・利用に関わる遺伝子の同定や低リン耐性植物の作出に関する研究が取り組まれている。これまでに申請者らはセスバニア属植物の優れたリン吸収能に着目し、土壌中の難溶性リンの吸収に優れることや共生する根粒菌にリン溶解能があることを見出してきた。しかし、DBR は局所的に存在するリンに反応し、それを取り囲むように発達することから、リン吸収に直結する形質であると考えられる。また、クラスター根の形成はリン酸吸収を補助するアーバスキュラー菌根 (AM) 菌との共生を代替するリン獲得戦略であるが、セスバニアは AM 菌とも共生可能な植物である。これらのことから、セスバニアは多様なリン飢餓回避機構を発達させた植物であると考えられる。

## 2. 研究の目的

*Sesbania* 属植物のリン欠乏条件に対する適応反応の中でも、特に根系形態とリン吸収との関係は明らかになっていない。直接養分を吸収する器官である根の形態を調査することは、植物のリン獲得戦略を考える際に重要であると考えられる。また、初期生育時のリン吸収量が作物のその後の生長や根系の拡大を左右するとされる。そこで本研究では、低リン条件で *Sesbania cannabina* は根系形態を変化させるのではないかと考え、生育初期時の低リン条件に対する本作物の適応反応を根系形態から評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) リン施肥量の違いが根系形態および根のリン酸獲得関連酵素活性に及ぼす影響

リンの施肥量 (mg P/kg) を変えた処理区 P0、P10、P100、P500、P1000 区を設け、粒状の可溶性リン酸を黒ボク土に混和して生育させ、植物体の乾物重とともに根系形態の違いを調査し、リン酸獲得関連酵素として酸性ホスファターゼ (ACP) とホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の活性をそれぞれ分析した。

### 2) 発達段階別の DBR における水溶性リン含有量が地上部の生育に及ぼす影響

DBR の形態的特性を発達段階ごとに評価するとともに、発達段階別に DBR の水溶性リン濃度を測定することで地上部の生育との関係を調査した。角型シャーレに過石を 1 粒与え、一定期間生育させ、側根の発生程度によって DBR の発達段階を評価した。すなわち、DBR が形成されている根を 1 次とした場合に、根が 2 次まで発生しているものを段階 1、3 次まで発生しているものを段階 2、4 次以上のものを段階 3 と定義づけた。また、根の水溶性リン濃度は水を加えて根を破砕し、モリブデン青法で測定した。

### 3) DBR の形成と土壌環境

DBR はリン肥料を囲みこむ際に著しい土壌の付着を伴うことから、次に DBR が包み込んだ土壌に着目した。すなわち、根箱に土壌懸濁液を混和した土を充填し、過石 15 粒を与えて生育させた。DBR が包み込んだ土壌と DBR 以外の根における根圏土壌、過石周辺土壌および非根圏土壌をそれぞれ採取し、可給態リン酸濃度、土壌 pH および微生物バイオマス量を分析した。

### 4) アーバスキュラー菌根 (AM) 菌の感染が DBR の形成に及ぼす影響

リン栄養を向上させる AM 菌とリン獲得への関与が示された DBR との関係について検討した。DBR の形成が認められた P10 区と P100 区に AM 菌接種 / 非接種区を設け、AM 菌の接種が DBR の形成に及ぼす影響を調査した。また、P10 区で AM 菌を接種した黒ボク土で *S. cannabina* を 8~23 日間生育させ、経時的に根系における DBR 数および AM 菌感染率と地上部リン含有量の推移を調査した。

## 4. 研究成果

### 1) リン施肥量の違いが根系形態および根のリン酸獲得関連酵素活性に及ぼす影響

地上部乾物重は P100、P500、P1000 区で差異が認められず、根乾物重は P0 区を除く処理区間で差異が認められなかった。根系の観察結果から P10 区と P100 区では、高次に側根が発達した根 (以下、DBR: Densely Branched Root) がパッチ状に認められた。次に、P10、P100、P500 区について根内の ACP 活性および PEPC 活性を比較したところ、両活性ともに P10 区で高かったが、同処理区の DBR に限って評価した場合はその傾向がみられなかった。P0 区では DBR の形成が認められず、低リン条件と考えられた P10 区と P100 区でのみ DBR の形成がみられたことから、DBR の形成が低リン条件下におけるリン獲得に関与していることが示唆された。

### 2) 発達段階別の DBR における水溶性リン含有量が地上部の生育に及ぼす影響

同一根系内における DBR と他の根を比較すると、側根密度は DBR で高く、水溶性リン濃度や根毛密度も高い値を示した。次に、DBR の発達段階ごとに比べると、段階が上

がるほど側根密度は高くなった。地上部の生育を目的変数、DBR の段階 1、2、3 の水溶性リン含有量、播種後日数を説明変数として重回帰分析を行った結果、地上部新鮮重の増加には段階 2 と 3 の DBR の水溶性リン含有量が寄与していた。これらのことから、DBR は他の根と比べて側根に加えて根毛もよく発達しており、近傍に存在するリンの吸収を向上させていることが示唆された。本実験では DBR の発達が進むにつれてリン吸収量は増加し、地上部の生育を向上させる可能性が示唆された。

### 3) DBR の形成と土壌環境

可給態リン酸濃度は過石周辺土壌よりも DBR が取り囲んだ土壌で有意に高く、土壌 pH は DBR の土壌で最も低かった。さらに、これらの土壌を用いたリン脂質脂肪酸分析の結果から、DBR の土壌は微生物バイオマス量が最も高く、他の土壌と異なる微生物相が形成されていた。DBR は単にリンを囲い込むことでリン吸収を促進するのではなく、リンと一緒に囲み込んだ土壌の環境を変化させていることが示唆された。まず、DBR には著しく土壌粒子が付着していることからムシゲルなどの粘性物質が多く放出されていることが推察された。ムシゲルは根冠や根毛から多量に分泌されるため、高次側根や根毛の発達が著しい DBR ではムシゲルの分泌量が多いと考えられる。黒ボク土ではリン肥料から溶出したリンが土壌に吸着されるが、DBR に囲まれた土壌がムシゲルの分泌によって湿潤状態に保たれることにより、リン肥料からのリン溶出を促進している可能性が推察される。DBR に囲まれた土壌は非根圏土壌と比較して微生物バイオマス量が高く、また非根圏土壌や根圏土壌と異なる微生物相が形成された。微生物バイオマス量が高かったことは上述したようにムシゲルの放出量が多かったことが原因であると推察される。微生物の増殖にはリンも必要であるが DBR に囲まれた土壌ではリンも容易に獲得できるため、DBR に囲まれた土壌環境は土壌微生物が増殖する上で格好の条件であったと推察される。一方、土壌微生物相に着目すると DBR に囲まれた土壌ではグラム陰性菌と糸状菌の割合が他の土壌と比較して高かった。

### 4) アーバスキュラー菌根 (AM) 菌の感染が DBR の形成に及ぼす影響

いずれのリン処理区においても AM 菌の接種によって DBR 数は減少した。なお、AM 菌の接種によって *S. cannabina* の地上部乾物重やリン含有量は高まった。根系では AM 菌の感染が DBR の形成よりも早く認められ、時間が経過するにつれ DBR 数と AM 菌感染率ともに高まった。地上部リン含有量と DBR 数あるいは AM 菌感染率との関係はサンプリング時期によって異なる傾向を示したが、実験終了時の 23 日目においては AM 菌感染率とは正の相関があったのに対し、DBR 数とは関係がみられなかった。これらのことから、

*S. cannabina* は DBR と AM 菌の両者を利用してリンを吸収しており、AM 菌の感染が DBR の形成を抑制していることが示唆された。また、本実験では DBR の形成時に地上部リン含有量が増加する傾向がみられたが、DBR 数が地上部リン含有量の増加に必ずしも結び付かないことが示された。

以上、本研究において低リン条件下で生育させた *S. cannabina* は根系内に DBR を形成することによってリンを獲得することが示された。しかし、DBR の形成は黒ボク土や赤玉土などリン酸吸収係数が高い土壌に限定されたものであり、灰色低地土や水耕条件では地上部の生育量に関わらず形成が認められなかった。DBR 形成について様々な条件を検討した結果、黒ボク土において DBR は低リン条件でリンを与えた時や局所的に施用したリンに反応して形成され、窒素やカリウム、鉄、カルシウムに対しては形成されなかったことから、リンの局在化に反応して根を集中的に伸長させて形成されたことが示された。リン欠乏状態に陥った *S. cannabina* が根系構造を変化させてリンを獲得する際に、リンが拡散せず局所的に存在する土壌では DBR のように養分吸収を担う細根を集中的に発達させることでリンを吸収する方が効率的であるが、リンが広範囲に拡散しやすい灰色低地土や均一に存在する水耕条件では DBR を発達させるよりも根系全体を拡大させる方がリンを獲得する上で有益であると考えられる。

一般に地上部や地下部を問わず細胞分裂が活発に起こる初期生育時にリンは必要とされるが、黒ボク土のように比較的リン酸固定力が高い土壌で発芽した作物は種子内に貯蔵されたリン源の量にもよるが、根系の発達が不十分であるためリン欠乏を招きやすい。初期生育時のリン欠乏はその後の生育にも大きく影響し、結果として地上部の生育が制限される。一方、*S. cannabina* は黒ボク土中で可給化されたリンに対して即座に DBR を発達させ生育初期時に必要なリンを確保し、地上の生育を促進させる。このように生育初期における高いリン獲得能が *S. cannabina* の低リン耐性に関与していると考えられる。

DBR はリン獲得根として知られるクラスター根と形態的に類似したものであった。まず、共通点としては高密度に根が分岐するとともに、高次に側根を発達させ、根毛密度も高いという点が挙げられる。これらの性質はリンと接触する表面積が増加し、効率的にリンを吸収できることにつながる。相違点は獲得を試みるリンの形態が異なることである。すなわち、クラスター根は不可給化したリンを獲得するために有機酸の放出や有機態リンを加水分解する酸性ホスファターゼの分泌が積極的に行われる。一方、DBR は低リン条件においても、他の根と比べ有機酸合成に関与する酵素である PEPC 活性や酸性ホスフ

ァターゼ活性が低かったことから、可給化したリンを獲得するためにDBRは形成される。リンを施肥しなかった黒ボク土においてDBRが形成されなかった結果からもこのことが考えられる。DBRとクラスター根のリン獲得能を単純に比較することはできないが、難溶性リンやフィチンなど不可給化したリンが多く蓄積されている黒ボク土においてはクラスター根の方が、リン獲得能が高い可能性がある。しかし、本研究においてDBRのPEPC活性や酸性ホスファターゼ活性を評価した実験では発達段階後期のDBRを用い、また根内部における酵素の活性を測定するのみに留まった。継時的な変化や根外への酸性ホスファターゼや有機酸の滲出について今後検討が必要である。

DBRは単にリンを囲い込むことでリン吸収を促進するのではなく、リンと一緒に囲み込んだ土壌の環境を変化させていることが示唆された。以下、DBRに囲まれた土壌でみられた環境の変化について考察する。まず、DBRには著しく土壌粒子が付着していることからムシゲルなどの粘性物質が多く放出されていることが推察された。ムシゲルは根冠や根毛から多量に分泌されるため、高次側根や根毛の発達が著しいDBRではムシゲルの分泌量が多いと考えられる。黒ボク土ではリン肥料から溶出したリンが土壌に吸着されるが、DBRに囲まれた土壌がムシゲルの分泌によって湿潤状態に保たれることにより、リン肥料からのリン溶出を促進している可能性が推察される。

次に、DBRに囲まれた土壌pHは明らかに低く維持されていた。土壌pHが低下した原因については様々なものが挙げられる。まず、リン肥料からリン酸が溶出したことによりpHが低下したことが考えられる。また、リン酸はプロトンとの共輸送によって根に取り込まれることから、DBRからプロトンを積極的に放出された結果、pH低下につながった可能性がある。さらに、DBRやDBRに囲まれた土壌の微生物の呼吸によって排出されるCO<sub>2</sub>の一部が土壌溶液に溶け込むことでpHを低下させたことも考えられる。DBRに囲まれた土壌で確認されたpH低下の原因は今後の検討課題として残った。

DBRに囲まれた土壌は非根圏土壌と比較して微生物バイオマス量が高く、また非根圏土壌や根圏土壌と異なる微生物相が形成された。微生物バイオマス量が高かったことは上述したようにムシゲルの放出量が多かったことが原因であると推察される。微生物の増殖にはリンも必要であるがDBRに囲まれた土壌ではリンも容易に獲得できるため、DBRに囲まれた土壌環境は土壌微生物が増殖する上で格好の条件であったと推察される。一方、土壌微生物相に着目するとDBRに囲まれた土壌ではグラム陰性菌と糸状菌の割合が他の土壌と比較して高かった。

他作物におけるDBR形成の可能性調査し

たところコマツナ、ライムギ、エンバクにおいても過リン酸石灰の周りに集中して根が発達した。白花ルーピンでは、リン肥料の周り以外にもクラスター根が形成されていたことから、リン欠乏条件でクラスター根をリンの存在に関係なくランダムに形成するとされる。しかし、今回の観察の結果からリン肥料周辺のクラスター根は他より大きいクラスター根が形成されていた。このことから、白花ルーピンでもリン肥料の周りに多くクラスター根が形成されることが示された。コマツナではアブラナ科で報告のある「リン獲得根伸長」という現象がみられた。*S. cannabina*と同様に、過リン酸石灰があるところに根が通ると、早い段階からリン獲得根が形成された。そのため、*S. cannabina*と同様にリンへの反応性が高いと考えられる。一方、ライムギとエンバクでは、新しくDBRのような根が形成されることが明らかとなった。ライムギとエンバクでは、DBRのような根は過リン酸石灰付近を根が通過してもすぐには形成されず、しばらくしてから反応であった。また、それぞれの形態変化された根をみると、植物によって根の絡み付きの程度と土壌の付着具合が異なっていた。本実験で用いた冬作物では生育時の土壌微生物活性が低く、微生物の働きによるリンの無機化が抑制されると予想されることから、DBRを形成して積極的にリン獲得を図ることが推察された。現在は、世界のコアコレクションを用いてダイズにおけるDBR形成について研究を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Funakoshi Y, Daimon H, Matsumura A.\* 2015. Formation of densely branched lateral roots in *Sesbania cannabina* triggered by patchily distributed phosphorus in andosolic soils.

雑誌名: Plant Root 9: 24-33. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

船越有里・松村篤. 黒ボク土において *Sesbania cannabina* がリン獲得のために形成する分枝根と土壌微生物との関係 第42回根研究集会. (2016年6月6日, 秋田県立大学, 秋田県)

〔図書〕(計1件)

松村篤・大門弘幸. 2017. 作物栽培体系, 第8巻 飼料作物・緑肥作物の栽培と利用 - 夏作緑肥作物 - pp 183-205. 朝倉書店. (総ページ数: 232)

〔その他〕

ホームページ等

<http://saibaiseirigaku.wixsite.com/crop-eco-physiology>

## 6. 研究組織

研究代表者

松村 篤 (MATSUMURA, Atsushi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号: 30463269