九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ダイズの根粒形成調整遺伝子，Rjの表現型決定器官と遺伝子間の相互作用

奥田，崇之
九州大学農学部植物栄養肥料学講座

山川，武夫
九州大学農学部植物栄養肥料学講座

石塚，潤爾
九州大学農学部植物栄養肥料学講座

https://doi.org/10.15017/23508

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 48 (1/2), pp.65-70, 1993-12. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第48巻 第1・2号 65-70 (1993)

ダイズの根粒形成調整遺伝子、*Rj* の表現型決定器官と遺伝子間の相互作用

奥田崇之・山川武夫・石塚潤爾
九州大学農学部植物栄養肥料学講座

(1993年8月23日受理)

The Organs Determining the Phenotypes of Nodulation Conditioning Genes of soybean (*Glycine max* L. Merr), Rj_2, Rj_3 and Rj_4, and the Phenotypic Interaction between Genotypes of Scions and Stoks

Takayuki OKUDA, Takeo YAMAKAWA
and Junji ISHIZUKA
Laboratory of Plant Nutrition and Soil Fertility, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-2, Fukuoka 812

緒言

ダイズ (*Glycine max* L. Merr) は，ダイズ根粒菌，*Bradyrhizobium japonicum* および *Rhizobium fredii* によって根粒を形成する．しかし，有効根粒の形成は宿主遺伝子型と根粒菌株の遺伝的特性によって調整される場合がある．根粒形成を調整する宿主の遺伝子としては，*nts*，rj_1，Rj_2～Rj_4 などがよく知られている．*nts* は，nitrate-tolelant symbiosis の略で，この遺伝子を保有する品種は，根粒形成の調節（オートレギュレーション）機構が欠損しているため，極端に多量の根粒を形成する，いわゆる超根粒着生品種であり，硝酸存在下でも根粒形成が阻害されない (Carroll *et al.*, 1985)．一般的にダイズでは，根粒数に比較して著しく多くの感染が起こるが，過剰な根粒形成を避けるためのオートレギュレーション機構が発達している．この機構を持つ通常のダイズでは，根粒菌の感染により，感染シグナルが発生し，それが地上部（葉）に移行し，そこで根粒形成抑制シグナルが生成する．それが根に移行して，新たな感染による根粒形成を抑制する．一方，*nts* ダイズでも根粒菌の感染により感染シグナルが生成し，地上部に移送されるが，地上部での根粒形成抑制シグナルの生成がブロックされているので，根粒形成が調節されない．その結果，根粒形成までに発達する感染の比率が著しく高くなり，通常品種の5～10倍の根粒が形成されることになる．したがって，*nts* 遺伝子の表現型，すなわち，超根粒着生は地上部で決定されると見られている．

rj_1 遺伝子保有品種は，ほとんどすべてのダイズ根粒菌で根粒を形成しない．(Williams and Lynch, 1954)．接ぎ木法により，この遺伝子の表現型は *nts* ダイズと異なり，根で決定されると考えられていた (Clark, 1957)．Tanner and Anderson (1963) は，根粒着生系統のダイズ (Rj_1) では，発芽後に子葉から根粒形成に必要なコチレドンファクターが，また，非着生系統のダイズ (rj_1) では，子葉から根粒形成を阻害するコチレドンファクターが根に移行し，根粒形成の有無を決定している可能性を想定した．その可能性を検討するためには，コチレドンファクターが根に移行する前，rj_1 ダイズの根に根粒着生系統の Rj_1 ダイズの地上部を，また逆に，Rj_1 ダイズの根に rj_1 ダイズの地上部を接ぎ木し，根粒形成の有無を調査することによってこれを証明しようとした．しかし，いずれの場合も，地上部からのコチレドンファクターが根粒着生の有無の決定に関与する可能性を証明できず，根粒着生の有無は根の遺伝子型よって決定されるとの結論が得られ，Clark (1957) の説が支持された．

優性遺伝子 Rj_2，Rj_3，Rj_4 をもつ品種は，特定の遺伝的特性を持つ根粒菌株の根粒形成を抑制する (Caldwell, 1966; Vest, 1970; Vest and Caldwell, 1972)．例えば，Rj_2Rj_3 遺伝子をもつ品種 CNS, IAC-2, Hardee はダイズ根粒菌 USDA122 や Is-1 により

有効根粒を形成せず，Rj_4 をもつ品種 Hill やアキセンゴクは，根粒菌 USDA61 や Is-34 で有効根粒を形成しない（Ishizuka *et al.*, 1991）．この種の遺伝子の表現型がどの器官で決定されているかはまだ定まっていない．そこで，接ぎ木法により *Rj* 遺伝子の表現型の決定器官を明らかにし，また，これらの表現型が遺伝子型の異なる穂木・台木の組合せによりどの様に変化するかを検討した．

材　　料

材料

ダイズ（*Glycine max* L. Merr）*nts*1007: 超根粒着生・硝酸耐性変異系統，Carroll *et al.*（1985）により Bragg の突然変異株から分離，Bragg: *Rj* 遺伝子非保有品種，IAC-2, CNS: Rj_2Rj_3 保有品種（Ishizuka *et al.*, 1991），Hill: Rj_4 保有品種．

ダイズ根粒菌（*Bradyrhizobium japonicum*）Is-1: Rj_2Rj_3 保有ダイズ品種（IAC-2, CNS）で有効根粒をほとんど形成しない，Is-34: Rj_4 保有ダイズ品種（Hill）で有効根粒をほとんど形成しない．いずれも農林水産省農業技術研究所，筑波圃場で 1980 年に分離されたものである（Ishizuka *et al.*, 1991）．

方　　法

幼植物の接ぎ木

100ml の三角フラスコにバーミキュライトを充塡，水耕液（Ishizuka *et al.* 1991）を加えて滅菌し，5％次亜塩素酸ナトリウムとエタノールで殺菌し，滅菌脱イオン水で洗浄したダイズ種子 1 粒を播種し，初生葉が伸長開始した播種 10 日後，茎を子葉下 2 cm で切断，地上部，根部を互いに交換して接ぎ木を行った．接ぎ木植物はその品種の組合せで表示し，例えば，穂木が Hill, 台木が IAC-2 の場合は Hill/IAC-2 とした．接ぎ木後は蒸散を防ぐためにビニール袋で覆った．17 日目にビニール袋を取りはずし，活着を確認してから 10^6 cells/plant の根粒菌を接種した．接種後，環境調節実験室（30 °C，自然光）で生育させ，3 週間後に抜取り，その根粒着生状況を調査した．

子葉の有無が接ぎ木植物の根粒形成に及ぼす影響を検討するため，子葉を切除した穂木を用いて対比したが，この場合は品種名のあとに「-C」を付けて表示した．

発芽前接ぎ木

ダイズ，Hill の種子を 5％次亜塩素酸ナトリウム，ついでエタノールで表面殺菌し，滅菌脱イオン水で洗浄，種皮をはぎ取ってから幼根を切り採り，滅菌シャーレ内の脱イオン水で湿らした濾紙上で 3 日間吸水させた（台木）．ダイズ，CNS の種子を同様に殺菌し，3 日間滅菌シャーレ中で吸水させ，幼根を切除，その切口に上記 Hill の幼根の切口を接着させた．6 日間静置，生育させた後，滅菌したバーミキュライトに移植した．これらの操作はすべてクリーンベンチ内で無菌的に行った．19 日目に台木品種 Hill に親和性のダイズ根粒菌 Is-1 を接種，3 週間生育させた後，根粒着生状況を調査した．

結果と考察

nts 1007 を穂木または台木とした接ぎ木の根粒形成

表－1 の上段は，*nts*1007 を台木とした場合であるが，*nts*1007 の穂木では超根粒着生となり，それ以外の遺伝子型のダイズ穂木では，穂木の遺伝子型に関わらず，いずれの菌株によっても 50 個前後の有効根粒が認められ，根粒数は下段に示した穂木・台木とも同一遺伝子型の接ぎ木植物と大差がなかった．接種区では，いずれの菌株でも無効根粒の形成は認められなかった．＊印を付した Bragg/*nts*1007 の無接種区で無効根粒の着生があったが，これは 3 個体中の 1 個体のみであって，その理由については分からない．

中段の *nts*1007 を穂木とし，各種 *Rj* 遺伝子型ダイズを台木とした接ぎ木に根粒菌を接種した場合の根粒着生状況は，台木品種に親和的な根粒菌を接種した場合，超根粒着生が見られた．すなわち，*nts*1007/Hill では，Hill に親和性の Is-1 接種で 200 以上，*nts*1007/IAC-2 では，IAC-2 に親和性の Is-34 接種で 300 以上の根粒が着生し，表現型はいずれも超根粒着生であった．超根粒着生個体の根粒数は微小根粒を含み，正確な計数及び無効根粒の判定が不能であったので，有効根粒数は下限を示し，無効根粒数は ND と表示した．ただし，根粒内部は調査したすべての根粒で赤色が観察され，有効根粒と判定したが，その赤色が薄い根粒，赤色部分の狭い根粒が高い比率を示した．台木品種と非親和的な根粒菌を接種した場合，すなわち，*nts*1007/Hill に Is-34, *nts*1007/IAC-2 に Is-1 を接種した場合は有効根粒がほとんど形成されず，無効根粒が形成された．

以上の結果から有効根粒形成の有無は台木 *Rj* 品種に対する接種根粒菌の親和性の有無によって決定され，超根粒着生表現型は穂木によって決定されると判断した．

Table 1. Nodulation on the root of soybean cultivars carrying *Rj*-genes and supernodulating mutant (*nts*1007) grafted reciprocally.

Grafted plant (Scion/Stock)	Inoculum	Tested plant number	Nodule number Effective	Ineffective
Bragg/*nts*1007	Is- 1	1	61.0± 0.0	0.0± 0.0
	Is-34	4	51.5± 7.2	0.0± 0.0
	non	3	0.0± 0.0	10.7±15.1*
IAC-2/*nts*1007	Is- 1	3	54.0± 5.1	0.0± 0.0
	Is-34	3	54.3± 3.3	0.0± 0.0
	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Hill/*nts*1007	Is- 1	3	52.7± 6.9	0.0± 0.0
	Is-34	3	50.3± 3.1	0.0± 0.0
	non	3	0.0± 0.0	0.0± 0.0
*nts*1007/Bragg	Is- 1	3	more than 250	ND
	Is-34	3	more than 300	ND
	non	1	0.0± 0.0	0.0± 0.0
*nts*1007/IAC-2	Is- 1	3	0.7± 0.9	71.3±26.3
	Is-34	3	more than 300	ND
	non	2	0.0± 0.0	56.5±56.5*
*nts*1007/Hill	Is- 1	3	more than 200	ND
	Is-34	4	6.0± 3.4	65.3±33.9
	non	4	0.0± 0.0	6.5±11.3*
*nts*1007/*nts*1007	Is- 1	4	more than 300	ND
	Is-34	4	more than 300	ND
	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Bragg/Bragg	Is- 1	3	46.0± 3.6	0.0± 0.0
	Is-34	4	44.8±14.4	0.0± 0.0
	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
IAC-2/IAC-2	Is- 1	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
	Is-34	4	55.8± 9.4	0.0± 0.0
	non	4	0.3± 0.4*	4.3± 7.4*
Hill/Hill	Is- 1	4	47.8± 9.1	0.0± 0.0
	Is-34	4	3.0± 2.5	67.8±17.6
	non	4	2.0± 3.5*	10.3±17.8*

*: Only one plant of the tested ones nodulated effectively or ineffectively.
ND: could not count due to superabundant effective nodulation.

Rj 品種同士の接ぎ木の根粒形成

表－2によると，台木品種に親和性の根粒菌株を接種した場合，すなわち，Is-34をCNS台木植物，Is-1をHill台木植物に接種した場合は，有効根粒が形成され，その数には大きな差はなかった．しかし，穂木の子葉切除は根粒数の減少と活着の遅延をもたらす傾向が認められた．これは，播種10日目でも養分供給源としての機能がまだ子葉に残存していたことを示すものと考えられる．無効根粒の形成は全く認められなかった．

台木*Rj*品種に非親和的な根粒菌を接種した場合，すなわち，Is-34をHill台木植物に，および，Is-1をCNS台木植物に接種した場合は，穂木の*Rj*遺伝子型に関わらず，有効根粒の形成はほとんど認められず，多くの無効根粒が形成された．無効根粒数に穂木の子葉切除の影響は認められなかった．

無接種区では，CNS-C/CNSの4個体中の1個体に多数の有効根粒が形成されたことを除くと有効，無効根粒とも形成されなかった．したがって，非親和性菌株接種による無効根粒の形成も接種菌株のなんらかの作用によって生じたものであると見ることができる．また，この作用は接種菌株に親和性の品種を穂木とし

Table 2. Nodulation on the roots of *Rj* genotypes of soybeans grafted shoots of *Rj* ones reciprocally.

Grafted plant (Scion／Stock)	Inoculant	Tested plant number	Nodule number Effective	Ineffective
CNS/CNS	Is-34	4	72.3±12.2	0.0± 0.0
CNS-C/CNS	Is-34	4	68.0±14.5	0.0± 0.0
Hill/CNS	Is-34	4	72.5± 9.5	0.0± 0.0
Hill-C/CNS	Is-34	4	55.8± 4.8	0.0± 0.0
CNS (intact)	Is-34	4	94.0±22.0	0.0± 0.0
CNS/Hill	Is- 1	4	83.8±16.0	0.0± 0.0
CNS-C/Hill	Is- 1	4	67.0±13.9	0.0± 0.0
Hill/Hill	Is- 1	4	67.3± 9.0	0.0± 0.0
Hill-C/Hill	Is- 1	4	45.0± 8.5	0.0± 0.0
Hill (intact)	Is- 1	4	63.0± 7.2	0.0± 0.0
CNS/CNS	Is- 1	4	0.3± 0.4	50.5±23.8
CNS-C/CNS	Is- 1	4	0.3± 0.4*	33.8±26.7
Hill/CNS	Is- 1	4	1.3± 1.3	44.3± 3.3
Hill-C/CNS	Is- 1	4	1.5± 0.5	41.8±19.0
CNS (intact)	Is- 1	4	1.3± 0.8	31.3±22.1
CNS/Hill	Is-34	4	0.5± 0.9	114.0±12.9
CNS-C/Hill	Is-34	4	0.5± 0.5	71.0±35.8
Hill/Hill	Is-34	4	1.3± 1.6	80.3±40.4
Hill-C/Hill	Is-34	4	0.8± 0.8	76.3±24.8
Hill (intact)	Is-34	4	0.5± 0.5	98.3±14.3
CNS/CNS	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
CNS-C/CNS	non	4	12.3±21.2*	0.0± 0.0
Hill/CNS	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Hill-C/CNS	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
CNS (intact)	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
CNS/Hill	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
CNS-C/Hill	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Hill/Hill	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Hill-C/Hill	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0
Hill (intact)	non	4	0.0± 0.0	0.0± 0.0

*: only one plant of the tested ones nodulated effectively or ineffectively, -C: scion detached cotyledons.

て接いでも影響されない．また，無効根粒は感染から有効根粒の形成までの過程のいずれかの反応が阻害されたためと考えることが出来るが，表－2に示したCNS台木の接ぎ木にIs-1を接種した場合は30～50，Hill台木にIs-34を接種した場合は70～110で，表－1の*nts*1007/IAC-2にIs-1，*nts*1007/HillにIs-34を接種した場合は約70であり，実験が同時に行われたものでないことを考慮すると，穂木の遺伝子型により差があると見ることは出来ない．無効根粒の形成には，オートレギュレーション機構を欠く*nts*1007を穂木とした場合でも，有効根粒の超根粒着生と類似の現象は起こらなかった．

以上の結果から，着生根粒が有効か無効かは台木*Rj*品種に対する接種根粒菌の親和性により決定され，穂木の*Rj*遺伝子型の影響は受けないと判断した．

発芽前接ぎ木植物の根粒形成

このように，*Rj*遺伝子の表現型は根によって決定されていると見ることが出来るが，本実験では，播種後10日目に接ぎ木しているので，それ以前に，すでに地上部から根粒形成抑制に関わるシグナルが根に移行したために，表現型決定要因が根に存在するかのような結論が得られた可能性は否定できない．もし，このようなシグナルの介在が事実とするならば，発芽前に接ぎ木することにより，その影響を排除でき，*Rj*遺伝子の表現型が根の遺伝子型と異なる可能性がある．

そこで，発芽前の接ぎ木の根粒形成を検討した．

図－1は Hill の幼根に CNS の下胚軸を接ぎ木，滅菌バーミキュライトに播種，Hill の親和性菌株 Is-1 を接種し，3週間後の根粒着生の状況を示した模式図で，接着位置の上部からも側根が発生した．そこで，根粒着生数を穂木・台木由来の根に分けて計測し，表－3に示した．接ぎ木が成功した植物1，2では有効根粒の着生は接着位置より下部に発生した側根，すなわち，Hill の幼根に由来する根に限定され，穂木品種 CNS に由来する根には無効根粒の発生も認められなかった．一方，接ぎ木が不成功に終わり，幼根の欠落した植物3～7を同様に移植し，Is-1 を接種，生育させたところ，これらの個体は下胚軸から側根が発生したが，有効根粒が全く形成されず，無効根粒が着生した．これは接ぎ木が成功し，有効根粒が形成されると根粒着生シグナルが生成し，これが引金になって根粒形成抑制シグナルが転送され，穂木由来の側根に無効根粒が形成されなかったもので，遺伝子型が異なる植物の根に生じた根粒着生シグナルも根粒着生抑制シグナルを生成させるためと見ることが出来る．Hill の幼根が脱落すると，有効根粒が形成されないため，根粒着生抑制シグナルが生成されず，非親和性菌株 Is-1 の作用で無効根粒が形成されたと見ることができる．

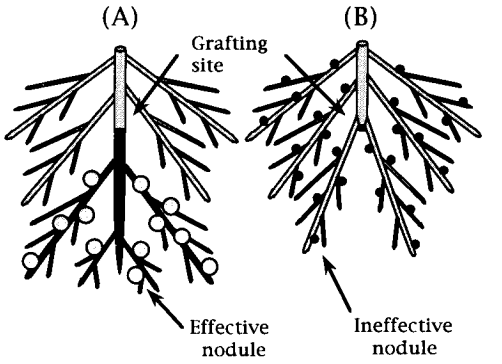

Fig. 1. Nodulation on root systems of soybean cv. CNS grafted the radicle of cv. Hill successfully (A) and unsuccessfully (B)

Table 3. Nodulation of soybean cv. CNS grafted onto the radicle of cv. Hill before germination and inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* Is-1 which is compatible with Hill and incompatible with CNS. The stocks of plants 3-7 disconnected from the scions.

Plant	Grafting	Nodule number			
		Root from scion (CNS)		Root from stock (Hill)	
		Effective	ineffective	Effective	Ineffective
1	successful	0	0	94	0
2		0	0	83	0
3	unsuccessful	0	55		
4		0	54		
5		0	39		
6		0	33		
7		0	49		

以上の実験で発芽開始以前の Rj_4 遺伝子型ダイズの幼根に Rj_2Rj_3 遺伝子型の胚軸を接いでも Rj_4 表現型が認められたことは，子葉や胚軸からの根粒形成抑制シグナルの移行を否定するもので，前実験から得られた *Rj* 遺伝子の表現型が根で決定されるとの仮説を補強するものであり，*Rj* 遺伝子保有ダイズの表現型は，*nts* の表現型とは異なり，rj_1 と同様，根で決定されると判断した．

摘　　要

ダイズ根粒菌 Is-1, Is-34 によるダイズの根粒形成の抑制に関与する遺伝子，Rj_2，Rj_3，Rj_4 の表現型を決定する器官を明らかにするため，接ぎ木法によって検討し，次の結果を得た．

1．*Rj* 遺伝子の表現型，すなわち特定の非親和性菌株による無効根粒形成の有無は根で決定される．台木品種に非親和性の根粒菌を接種した場合は無効根粒を形成し，その数は穂木の遺伝子型の影響を受けない．

2．親和性菌株による有効根粒の着生数は穂木の *Rj* 遺伝子型の影響は受けない．しかし，*nts* ダイズが穂木で，台木品種に親和性の根粒菌が接種された場合は表現型は超根粒着生となる．

文　献

Caldwell, B. E. 1966 Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.*, **6**: 427-428

Carroll, B. J., D. L. McNeil and P. M. Gresshoff 1985 Isolation and properties of soybean (*Glycine max* L.) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 4162-4166

Clark, F. E. 1957 Nodulation responses of two near isogenic lines of soybean. *Can. J. Microbiol.* **3**: 113-123

Ishizuka, J., Y. Suemasu and K. Mizogami 1991 Preference of *Rj*-soybean cultivars for *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **37**: 15-21

Tanner, J. W. and I. C. Anderson 1963 Investigation on non-nodulating and nodulating soybean strains. *Can. J. Plant Sci.*, **43**: 542-546

Vest, G. 1970 Rj_3-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop* Sci., **10**: 35-35

Vest, G. and B. E. Caldwell 1972 Rj_4-A gene conditioning ineffective nodulation of *Glycine max* L. Merrill. *Crop Sci.*, **12**: 692-693

Williams, L. F. and D. L. Lynch 1954 Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. *Agron. J.*, **46**: 28-29

summary

In order to verify the organs involved in determination of nodulation responses of soybeans carrying nodulation conditioning genes, Rj_2, Rj_3 and Rj_4, various genotypes of soybean plants, $Rj_{2\text{-}4}$, non-*Rj* and nitrate-tolerant symbiosis (*nts*) were separated into shoots and roots, grafted reciprocally and the effects of genotypes of scions on nodulation on the roots of various genotypes were examined. The following results were obtained.

1. The phenotypes of *Rj* genes, e. g. whether nodulation was effective or ineffective, were determined by the root genotypes. When the incompatible strains with genotypes of stock were inoculated, ineffective nodules were formed and their number did not influenced by the shoot genotypes.

2. When compatible strains with the genotypes of stock were inoculated, only effective nodules were formed. In these cases, the numbers of effective nodules did not influenced by *Rj*-genotypes of scions. However, when the scion of *nts* mutant was grafted on the stock of *Rj*-genotype, and compatible rhizobial strain with the genotypes of stock was inoculated, the phenotype was super-abundant nodulation.