

Effect of inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with different compatibility on deformation of root hairs in soybean plant

山川, 武夫
九州大学大学院農学研究院

平, 謙次郎
(株)ウエスコ岡山支社環境計画部生活環境部

<https://doi.org/10.15017/8848>

出版情報 : 九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 61 (2), pp.177-183, 2006-10-27. Faculty of Agriculture, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



ダイズの根毛の変形に及ぼす親和性の異なる根粒菌株接種の影響

山 川 武 夫*・平 謙次郎¹

九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座植物栄養学研究室
(2006年6月23日受付, 2006年7月24日受理)

Effect of inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with different compatibility on deformation of root hairs in soybean plant

Takeo YAMAKAWA* and Kenjirou TAIRA¹

Laboratory of Plant Nutrition, Department of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒 言

マメ科植物の根粒は、宿主植物根における根粒菌の窒素固定能がきわめて効率よく発揮できるように、特殊に分化した器官である (van Rhijn and Vanderleyden, 1995)。根粒形成は、根粒菌と宿主植物との相互認識から始まる (河内, 1993; 赤尾ら, 1994)。宿主を認識して根毛に付着した菌は根毛をカーリングさせ、感染糸を通して根粒内へ侵入し、増殖し、バクテロイドへと形態を変化させるとともに、根の皮層細胞を分化させ、根粒を形成すると考えられている。そこで根粒菌 (バクテロイド) は宿主に対してエネルギー源である炭素源を要求する代わりに、窒素固定を行い、宿主植物の生育に必要な窒素を供給する (Brewin, 1991; Kijne, 1992; 赤尾ら, 1994)。根粒菌接種による根毛の最初の変化には、カーリング以前に根毛の変形 (deformation) が起こることが知られており (Fisher and Long, 1992; Heidstra *et al.*, 1994)、その外見上の特徴から隣接した根毛がらせん状に巻き付くスパイラル型、根毛の先が球状となるスパチュラ型、根毛が2本に枝分かれしているブランチ型、根毛の先が小さく基が太くなるバルーン型などに分類することができ、根毛の様々な発達段階での根粒菌接種が、deformationの型を決定するとの報告が Wood and Newcomb (1989) によってなされた。しかし、既に根粒菌が存在する環境に根が伸長するような場合、す

なわち根に根毛が発生していない時点で根粒菌を接種した場合、それが根毛の発生及びその後の経時的变化に与える影響については明らかになっていない。

ダイズ品種には特定の血清型の根粒菌に対して有効根粒形成を抑制する根粒形成調整遺伝子 (*Rj* 遺伝子) を保有するダイズ品種が知られている (Caldwell, 1966; Vest, 1970; Caldwell *et al.*, 1966; Vest and Caldwell, 1971; Davine and Kuykendall, 1996)。*Rj₃* 遺伝子を保有する CNS は、*Bradyrhizobium japonicum* USDA122や *B. japonicum* Is-1による有効根粒の形成を抑制し、*Rj₄* 遺伝子を保有する Hill やアキセンゴクは、*B. elkanii* USDA61や *B. japonicum* Is-34による有効根粒の形成を抑制する (Ishizuka *et al.*, 1991a; Saeki *et al.*, 1999)。しかしながら、*Rj* 遺伝子を保有しない Bragg は、どの根粒菌株によっても有効根粒を形成する。この有効根粒形成の抑制に関する要因は、根で発現されていることが明らかにされた (奥田ら, 1993)。一方、根粒菌はこれらの宿主に対する親和性の差に基づき、3種類の Nodulation type に分類することができる (Ishizuka *et al.*, 1991a; Ishizuka *et al.*, 1991b; Ishizuka, 1992)。すなわち、*Rj₃* 遺伝子型ダイズ品種に有効根粒を形成しない菌株を Nodulation type B、*Rj₄* 遺伝子型ダイズ品種に有効根粒を形成しない菌株を Nodulation type C、さらに、両 *Rj* 遺伝子型ダイズ品種に有効根粒を形成する根粒菌株を Nodulation type A と分類した。

¹(株) ウエスコ岡山支社環境計画部生活環境部

¹Department of Environment, Wesco Inc. Shimadahon-machi 2-5-35, Okayama 700-0033, Japan

*Corresponding author (E-mail: yamakawa@agr.kyushu-u.ac.jp)

この論文では、あるダイズ品種に有効根粒の形成能力がある根粒菌株を親和性菌株、有効根粒を形成できない根粒菌株を非親和性菌株と定義する。しかし、これらの *Rj* 遺伝子型ダイズ品種とある特定の根粒菌株との間に見られるこの親和性を決定する宿主特異性認識機構は十分に解明されていない。

そこで、数種の *Rj* 遺伝子型ダイズに親和性の異なる根粒菌を根毛が発生する前に接種し、主根及び根毛全体の継時的変化を調べ、主根の伸長や、根粒菌との親和性の差が根毛の発達及び deformation にどのような影響を与えるかを明らかにすることを本研究の目的とした。

材料と方法

1. ダイズ品種と培養方法

ダイズ品種としてある特定の根粒菌株との根粒形成の能力が異なる各種 *Rj* 遺伝子保有ダイズを用いた。すなわち、non-*Rj* 遺伝子型ダイズ品種の Bragg, *Rj*₂ 遺伝子型ダイズ品種の CNS, *Rj*₄ 遺伝子型ダイズ品種のアキセンゴクと Hill を用いた。ダイズ種子の殺菌、播種、発芽は、基本的に前報 (山川・平, 2005) に従って行った。すなわち、種子の殺菌は、2.5%次亜塩素酸ナトリウムに5分間浸し、ついで茶漉し上に種子を移しピペットを用いてエタノールで種子表面を5~6回洗浄して殺菌し、50mLの滅菌した無窒素の1/2 Hoagland 溶液 (pH 6.0) (Nakano *et al.*, 1997) 中に種子を入れよく攪拌して茶漉し上に戻す操作を5~6回繰り返すことで行った。種子の培養は、以下の様に行った。直径150mmのシャーレの底にNo. 2の濾紙 (Advantec Toyo) 2枚と硬質濾紙 (No. 4A, Advantec Toyo) 1枚を敷き培養液を加え、シャーレの蓋にNo. 2の濾紙1枚を培養液で湿らせて張り付けオートクレーブした。播種直前に濾紙が保持できるだけの培養液量に調節した。殺菌したダイズ種子を50粒蒔き、シャーレの蓋に張り付けた濾紙に余分な培養液が残っていない状態でセットし、培養を開始した。播種24時間後に10mLの培養液を濾紙に均等に広がるように与えた。播種48時間後に5mLの培養液または接種用根粒菌液を発芽種子の幼根当たり100 μ L 供与し、さらに24時間培養した。種子の培養は、各実験当たり3シャーレを、すなわち1実験当たり150粒の種子を用いた。

2. 根粒菌の培養と接種

ダイズ根粒菌である *B. japonicum* Is-1と *B. japonicum* Is-34を用いた。根粒菌は、YMB 液体培地

(Vincent, 1970) で振とう培養 (30°C, 100rpm, 8日間) して用いた。その後、培養菌液を滅菌済みの無窒素の1/2 Hoagland 溶液 (pH 6.0) で10,000倍に希釈し、播種48時間後の種子の幼根に1個体当たり100 μ L (5mL/50個体) を滴下することで行った。根粒菌を接種しない区は、滅菌済みの無窒素の1/2 Hoagland 溶液 (pH 6.0) を用いて同様に行った。

3. サンプルングと根毛の形態観察

根粒菌 *B. japonicum* Is-1または Is-34を接種後3, 6, 9, 12, 24時間目にそれぞれ15個体をサンプリングし、FAA 固定液 (70%エタノール: 酢酸: ホルムアルデヒド=90: 5: 5) に入れて保存した。

子葉節から根を切り、子葉節から根端まですなわち下胚軸+主根の長さを主根長として測定した。根毛長の測定は、光学顕微鏡 (Microflex HFX-2, Nikon製) のマイクロメーターを用い測定した。また、根に対する根毛の位置は、子葉節からの距離で示した。写真撮影は光学顕微鏡を用い、根を FAA 固定液に入れたままの状態で行った。

結果及び考察

1. 根粒菌の接種が主根の生育及び伸長に与える影響

根粒菌接種後の時間と主根長の伸長の関係を図1に示した。これによると接種後24時間以内では、根粒菌

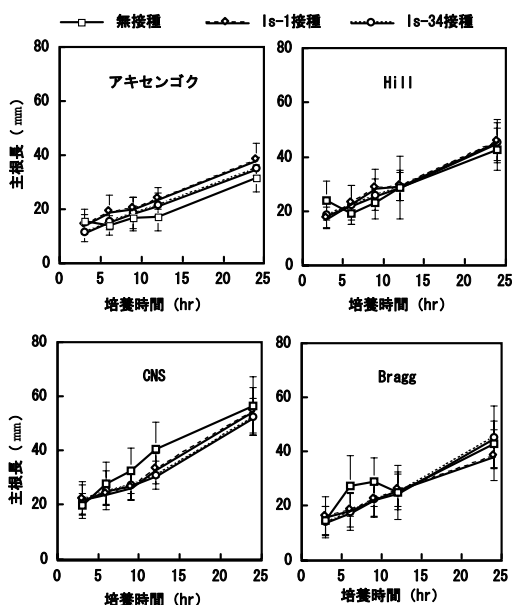


図1 主根の成長に及ぼす根粒菌接種の影響

が主根の伸長に与える影響は無いことが分かる。また親和性菌株または非親和性菌株を接種しても差が認められなかった。しかし、Zaat *et al.* (1987) は、コンベンチ (*Vicia sativa* L.) に *Rhizobium leguminosarum* を接種し、主根に与える影響を調べ、*R. leguminosarum* をフラボノイドと一緒に接種すると、主根の伸長が抑制されると報告した。その主根の伸長

を抑制させる因子 (Tsr factor : thick and short root factor) の遺伝子は、Sym プラスミド (共生に必要な遺伝子が存在している) 上に存在するので、Sym プラスミドを保持していない *B. japonicum* には、その因子が存在せず、主根の抑制効果がないのかもしれない。

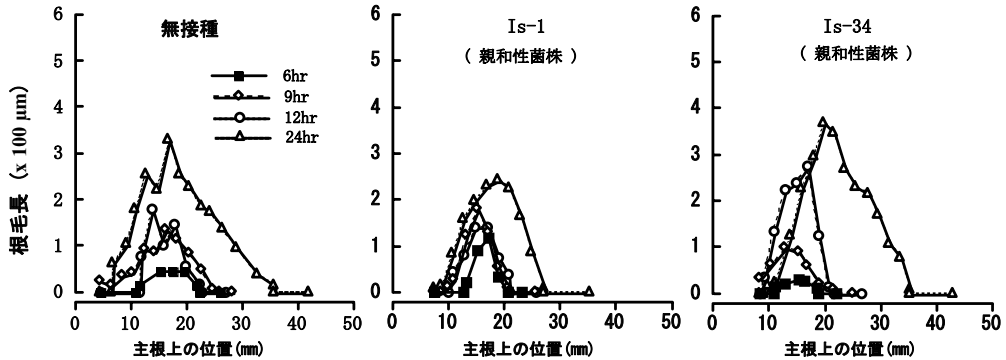


図2 ダイズ品種 Bragg の根基部 (子葉節) からの各距離での根毛長の時間的変化

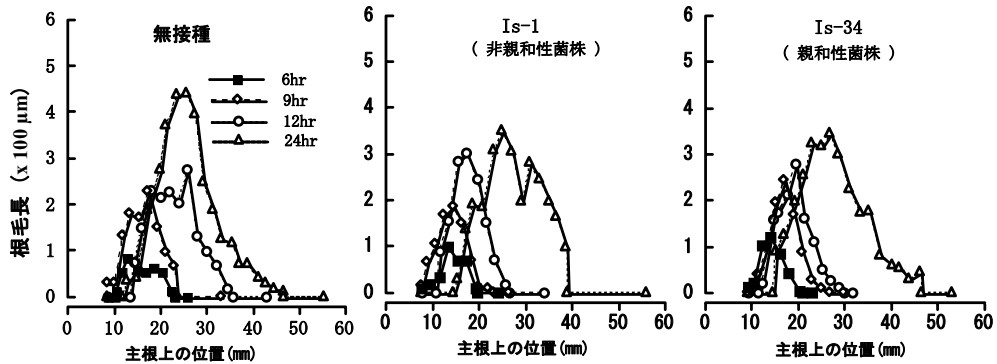


図3 ダイズ品種 CNS の根基部 (子葉節) からの各距離での根毛長の時間的変化

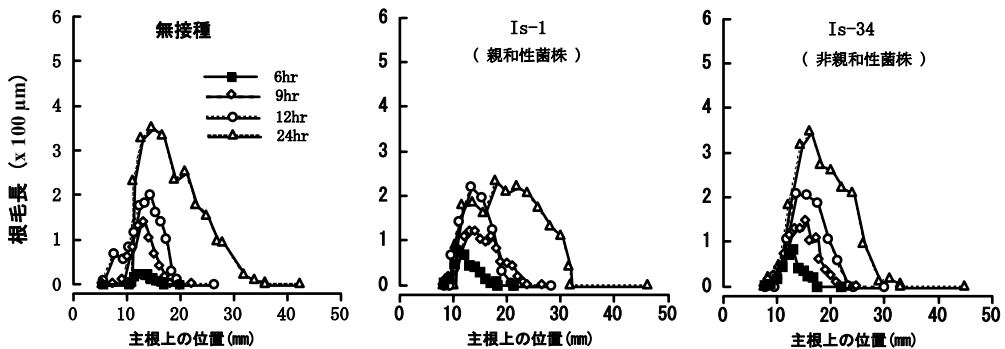


図4 ダイズ品種 Hill の根基部 (子葉節) からの各距離での根毛長の時間的変化

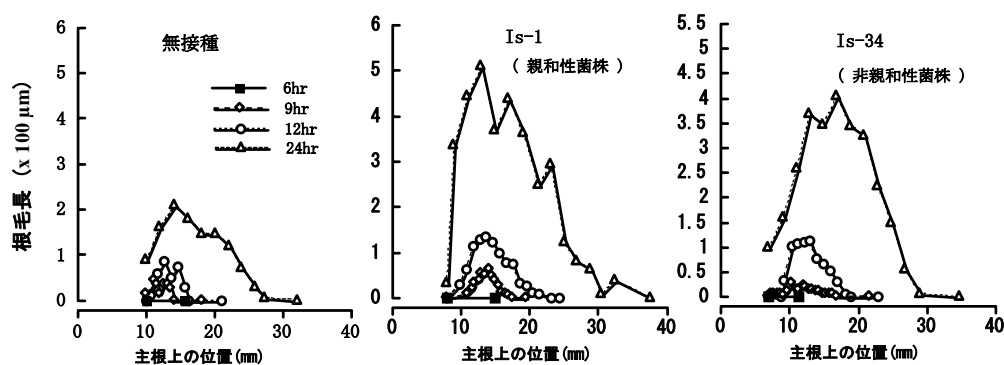


図5 ダイズ品種アキセンゴクの根基部（子葉節）からの各距離での根毛長の時間的変化

表1 根粒菌接種後24時間後の根毛の最大長と最長根毛の発生した主根上の位置に及ぼす根粒菌の親和性との関係

ダイズ品種 (<i>Rj</i> 遺伝子型)	接種菌	根粒 形成	最大根毛長 (μm)	根毛の伸長への 接種の影響	根毛発生位置 (mm)	根毛の発生への 接種の影響
Bragg (non- <i>Rj</i>)	無接種	—	330	—	16.9	—
	Is-1	親和性	244	抑制的效果	19.1	促進
	Is-34	親和性	368	変化なし	19.9	促進
CNS (<i>Rj</i> ₂ <i>Rj</i> ₃)	無接種	—	440	—	25.8	—
	Is-1	非親和性	350	抑制的效果	25.1	変化なし
	Is-34	親和性	344	抑制的效果	26.8	変化なし
Hill (<i>Rj</i> ₄)	無接種	—	352	—	14.8	—
	Is-1	親和性	232	抑制的效果	18.0	促進
	Is-34	非親和性	346	変化なし	16.3	促進
アキセンゴク (<i>Rj</i> ₄)	無接種	—	208	—	14.1	—
	Is-1	親和性	510	促進的效果	13.1	変化なし
	Is-34	非親和性	404	促進的效果	16.9	促進

表中の親和性はダイズ品種と根粒菌の間で有効根粒の形成を意味し、非親和性は有効根粒を形成できないことを意味する。根毛の発生への接種の影響の欄の促進は、図1で示された根粒菌の接種が根長に影響を与えないとの結果と併せて考えた時に、根の先端近くに発生した根毛が無接種に比較してより長く伸長すなわち時系列でより早く伸長したことを示す。

2. 根粒菌接種が根毛に与える影響

(1) 根毛の発生と根毛長の継時的変化

ダイズ4品種について、根粒菌接種後の根毛の発育状況を図2～5に示した。これによると、4品種とも接種後12時間までは無接種と比較しても、あまり変わらない成長を見せているが、24時間後にはそれぞれの品種で根毛の生育に変化が認められた。この24時間後の根毛発生の特徴を表1に示した。親和性菌株、非親和性菌株の接種が根毛の伸長に共通的に与える影響は認められなかった。

(2) 根毛の deformation

根粒菌接種24時間後の各ダイズ品種の主根の根毛の発生状態を光学顕微鏡によって撮影した写真を図6に示した。Hillにおいては、根毛の deformation は親和性菌株である Is-1 (E)、非親和性菌株である Is-34 (F)、あるいは無接種 (D) でも認められた。しかし、deformation の頻度は Is-1 を接種した時が最も多く、その形態はスパイラル型が多く確認された (E の矢印)。アキセンゴクにおいても、根毛の deformation は根粒菌の接種の有無に関わらず全ての処理で確認された。しかし、親和性菌株である Is-1 を接種すると、

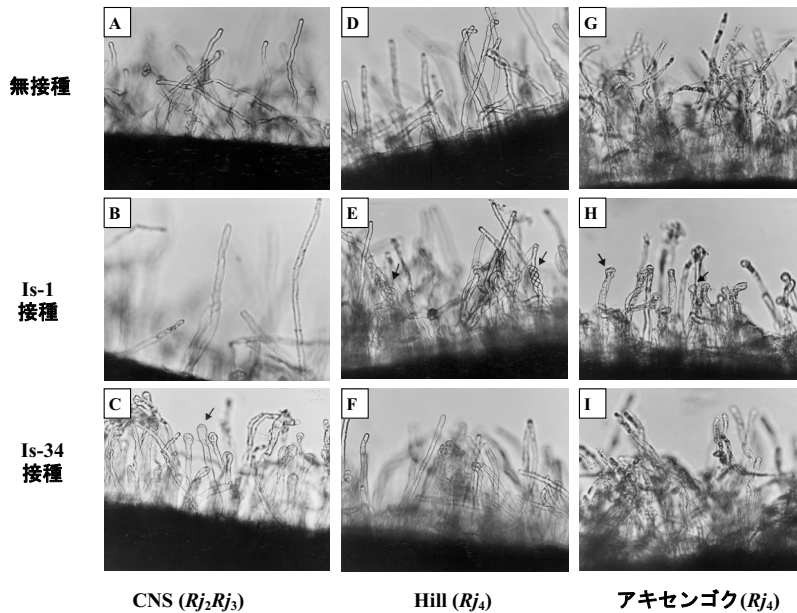


図6 各ダイズ品種の根粒菌接種24時間後と無接種の主根上に発生した根毛の形態的特徴
根毛の写真は、光学顕微鏡 (Microflex HFX-2, Nikon 製) で、根毛を FAA 固定液中に浮かせた状態で、100倍に拡大して撮影されたものである。()内は R_j 遺伝子型を示す。B, F, I は宿主ダイズと根粒菌との間で非親和性の関係にあり有効根粒を形成しない。C, E, H は宿主ダイズと根粒菌との間で親和性の関係にあり有効根粒を形成する。

A: 子葉節から約26mm 付近の写真でこの平均根毛長は300 μm , B: 子葉節から約25mm 付近の写真でこの平均根毛長は400 μm , C: 子葉節から約34mm 付近の写真でこの平均根毛長は200 μm , D: 子葉節から約19mm 付近の写真でこの平均根毛長は250 μm , E: 子葉節から約17mm 付近の写真でこの平均根毛長は270 μm , F: 子葉節から約18mm 付近の写真でこの平均根毛長は260 μm , G: 子葉節から約16mm 付近の写真でこの平均根毛長は400 μm , H: 子葉節から約18mm 付近の写真でこの平均根毛長は300 μm , I: 子葉節から約17mm 付近の写真でこの平均根毛長は350 μm .

deformation の形態はスパイラル型だけでなく、スパチュラ型になっているのも存在した (H の矢印)。CNS においても、アキシエンゴク同様、親和性菌株である Is-34 を接種すると、deformation の形態はスパイラル型だけでなく、スパチュラ型になっているのも認められた (C の矢印)。Bragg においても、根毛の deformation は根粒菌の接種の有無に関わらず全ての処理で確認された。接種後12時間目では、4品種ともスパイラル型の前段階と思われる根毛同士の接触は確認されたが、スパチュラ型の前段階と思われる根毛は確認されなかった。以上のように、親和性菌株の接種によって、根毛の deformation の頻度が上昇することが明白となった。ただし、ダイズの根毛の deformation の主な形態は、スパイラル型とスパチュラ型であり、Wood and Newcomb (1989) が報告したブランチ型やバルーン型は観察されなかった。また、根毛の deformation は根毛が新たに発生する根端に近

い方で多く観察され、基部に近い方では deformation が観察されなかった。これは、Heidstra *et al.* (1994) も報告しており、カラスノエンドウ (*Vicia sativa*) に *R. leguminosarum* bv *viciae* を接種し deformation 活性 (Had 活性) を検討したところ、deformation が根の先端から2~5mm の部位に局在していることを観察した。

これまで、多くの研究者 (Zaat *et al.*, 1987; Sanjuan *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 1992) が根毛の Had 活性を検討してきた。しかし、これらの Had 活性はすでに根毛が発達している根に根粒菌や Nod factor を滴下し、数時間あるいは数日後に観察しているが、deformation の起こっている根毛の場所 (先端や基部からの距離) は明らかでない。また、本研究で行ったような根毛の生えていない根に菌を接種し、根毛の継時的変化と同時に deformation を観察している研究は少ない。そうした中で、Wood and

Newcomb (1989) は、アルファルファ (*Medicago sativa*) において、根毛の様々な発達段階で *R. meliloti* を接種し、根毛の deformation の形態を観察した。それによると、根毛が発生して8時間後に菌を接種し、その2時間後にスパイラル型の deformation が観察されている。また、スパチュラ型は根毛が発生して6時間後に菌を接種し、その4時間後に観察されている。それ故、今回の実験において確認された deformation は、発芽開始から6~8時間で根毛が発達し、その後、菌が感染したと推測した。

本実験の観察結果では、deformation はスパイラル型とスパチュラ型が確認された。しかし、根毛がスパイラル型になるのは、無接種でも起こっているため、菌の影響によるものかは断定できなかった。そのため、今後は根粒菌を標識し、deformation が根毛表面での菌の存在によって引き起こされているかを確認しなければならない。また写真撮影時に FAA 固定液の中に入れていたが、FAA 固定液が deformation を引き起こしているかもしれないので、常法(北條・石塚, 1984)にしたがって、脱イオン水中でも調べてみる必要がある。

要 約

ダイズ品種として、non-*Rj* 遺伝子型の Bragg, *Rj*₂ 遺伝子型の CNS, *Rj*₄ 遺伝子型のアキセンゴクと Hill を用い、接種根粒菌として *Bradyrhizobium japonicum* Is-1 と *B. japonicum* Is-34 を用いた。*B. japonicum* Is-1 による有効根粒形成は *Rj*₂ 遺伝子によって抑制され、*B. japonicum* Is-34 による有効根粒形成は *Rj*₄ 遺伝子によって抑制される。根粒菌接種24時間後の主根の根毛の発生状態を光学顕微鏡によって観察した。Hill の根毛の deformation は親和性菌株である Is-1, 非親和性菌株である Is-34, あるいは無接種でも認められた。しかし、deformation の頻度は親和性菌株 Is-1 を接種した時が最も多く、その主な形態はスパイラル型であった。アキセンゴクの根毛の deformation も全ての接種処理で確認された。しかし、親和性菌株である Is-1 を接種すると、deformation の形態はスパイラル型だけでなく、スパチュラ型になっているものも存在した。CNS とアキセンゴクに親和性菌株である Is-34 を接種すると、deformation の形態はスパイラル型だけでなく、スパチュラ型も認められた。根毛の deformation は、基部に近い方では観察されず、主に根の先端に近い方で観察された。接種後12時間目では、4品種ともスパイラル型の前段階と思

われる根毛同士の接触は確認されたが、スパチュラ型の前段階と思われる根毛は確認されなかった。

文 献

- 赤尾勝一郎・横山 正・米山忠克 1994 マメ科植物と根粒菌のコミュニケーション 急速に解明の進む根粒誘導のシグナル物質, 科学と生物, 32: 135-140
- Brewin, N. J. 1991 Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7: 191-226
- Caldwell, B. E., K. Hinson and H. W. Johnson 1966 A strain-specific ineffective nodulation reaction in the soybean *Glycine max* L. Merrill. *Crop Sci.*, 6: 495-496
- Caldwell, B. E. 1966 Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.*, 6: 427-428
- Devine, T. E. and L. D. Kuykendall 1996 Host genetic control of symbiosis in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Soil*, 186: 173-187
- Fisher, R. F. and S. R. Long 1992 *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*, 357: 655-659
- Heidstra, R., R. Geurts, H. Franssen, H. P. Spaink, A. V. Kammen and T. Bisseling 1994 Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.*, 105: 787-797
- 北條良夫・石塚潤爾 1984 細胞・組織の観察, 最新作物生理実験法, 1-23
- Ishizuka, J. 1992 Trends in biological nitrogen fixation research and application. *Plant Soil*, 141: 197-209
- Ishizuka, J., Y. Suemasu and K. Mizogami 1991a Preference of *Rj*-soybean cultivars for *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37: 15-21
- Ishizuka, J., A. Yokoyama and Y. Suemasu 1991b Relationship between serotypes of *Bradyrhizobium japonicum* and their compatibility with *Rj*-cultivars for nodulation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37: 23-30
- 河内 宏 1993 根粒形成にかかわる宿主植物側遺伝子, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 67: 1077-1081
- Kijne, J. W. 1992 The *Rhizobium* infection process. In *Biological Nitrogen Fixation*, ed. by G. Stacy, R. H. Burris, and H. J. Evans, Chapman & Hall, New York, pp 349-398
- Nakano, Y., T. Yamakawa, M. Ikeda and J. Ishizuka 1997 Nodulation of *Rj*-Soybean varieties with *Rhizobium fredii* USDA 193 under limited supply of nutrients. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43: 929-932
- 奥田崇之・山川武夫・石塚潤爾 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, 九大農学芸誌, **48**: 65-70
- Saeki, Y., T. Yamakawa, M. Ikeda and J. Ishizuka 1999 Nodule formation and distribution of *Rj₃Rj₄*-genotype soybean infected with *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **43**: 317-326
- Sanjuan, J., R. W. Carlson, H. P. Spaink, U. R. Bhat, W. M. Barbour, J. Glushka and G. Stacey 1992 A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 8789-8793
- Schultze, M., B. Quiclet-Sire, E. Kondorosi, H. Virelizier, J. N. Glushka, G. Endre, S. D. Gero and A. Kondorosi 1992 *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharide exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 192-196
- van Rhijin P. and J. Vanderleyden 1995 The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.*, **59**: 124-142
- Vest, G. and B. E. Caldwell 1972 *Rj₄*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.*, **12**: 692-693
- Vest, G. 1970 *Rj₃*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.*, **10**: 34-35
- Vincent, J. M. 1970 A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook, No.15, Blackwell Scientific Publications Oxford
- Wood, S. M. and W. Newcomb 1989 Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hair by *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Bot.*, **67**: 3108-3122
- 山川武夫・平健次郎 2005 ダイズの発芽種子の根毛を良好に発生させるための培養条件と根毛分離, 土肥誌, **76**: 471-475
- Zaat, S. A. J., A. A. N. V. Brussel, T. Tak, E. Pees and B. J. J. Lugtenberg 1987 Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair response on common vetch. *J. Bacteriol.*, **169**: 3388-3391

Summary

Soybean (*Glycine max* L. Merr.) cultivars Bragg, CNS, Hill Akisengoku were used, these *Rj* genotypes were non-*Rj*, *Rj₂Rj₃*, *Rj₄* and *Rj₄*, respectively. *Bradyrhizobium japonicum* Is-1 and *B. japonicum* Is-34 were used as inoculum, and an effective nodulation by *B. japonicum* Is-1 is controlled by *Rj₃* gene and that by *B. japonicum* Is-34 is controlled by *Rj₄*. After 24 hour of inoculation, the deformation of root hair was observed by using an optical microscope. Deformation of the root hair of Hill was recognized by the inoculation of a compatible strain Is-1, an incompatible strain Is-34 or even non-inoculation. But, the frequency of deformation was highest when Is-1 was inoculated as a compatible strain and the main deformation was spiral type. The deformation of the root hair of Akisengoku was confirmed by all inoculation treatment, too. But, when the compatible strain Is-1 was inoculated, the main deformation was not only spiral type but also spatula type. The deformation of root hair was observed mainly at the position close to root tip but not at the position close to the basal root. Though the contact between the root hairs recognized as the previous stage of spiral type was confirmed, the root hair deformation considered as the previous stage of spatula type wasn't confirmed after 12 hour of inoculation in all soybean cultivars.