

コムギの無菌栽培とその根分泌物質

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	佐々木, 瑞雄 藤澤, 英司 小島, 邦彦
巻/号	59巻6号
掲載ページ	p. 601-606
発行年月	1988年12月

コムギの無菌栽培とその根分泌物質*

佐々木瑞雄**・藤澤英司***・小島邦彦**・大平幸次**

キーワード アルミニウム耐性, 根分泌物質, 無菌栽培, 有機酸

1. 緒 言

高等植物の根から放出される物質すなわち根分泌物質は、根圏微生物の栄養、生長促進因子、病原菌に対する拮抗作用、植物生長阻害因子など種々の影響をもたらすことが知られている。したがってその植物生理学的意義はきわめて重要であり、同時に根圏土壌を通じての作物生産に果たす役割はきわめて大きいものといわれている。

高等植物の生育の場としての土壌圏には、微生物をはじめとする種々の生物が共存している。したがって、植物そのものの生理、生態を研究する場合、これら微生物等の影響を排除することが必要不可欠になってくる。とくに根から放出された代謝産物は、自然条件下では速やかに微生物によって分解されてしまうので、その正確な量の把握は困難である。したがって、これまである種の微生物に関する研究を除いては、その影響を除去するのが難しいとして、ほとんど無視されてきた。しかし、より明確な研究を行うためには、植物の無菌栽培を行い、微生物の関与を完全に除去した状態で得た根分泌物質を調べる必要がある。

本報では、アルミニウムに対して感受性ならびに耐性のコムギ2品種を実験材料として、ビニールアイソレーター方式による無菌栽培を行い、そのときの生育状況や培地中に放出された根分泌物質の性質を調べた。そしてこれらが両品種間に存在する Al 耐性の差に関わる可能性を明らかにすると同時に、通常栽培のものと比較することにより、無菌栽培の意義と重要性を確認しようとした。

2. 材料および方法

1) 供試コムギ種子

Al 耐性の異なる PIMA77 (感受性) ならびに IAS58 (耐性) のコムギ2品種 (*Triticum aestivum* L.) を供試した。いずれも国際トウモロコシ・コムギ改良センターから入手し、本学部ガラス室で栽培し収穫した種子を用いた。

2) 無菌栽培方法

既報¹⁾に従いビニールアイソレーター方式によった。以下その必要事項について述べる。

(1) 滅菌種子のアイソレーターへの搬入および播種：PIMA ならびに IAS の種子を約 60 粒選び、50ml の三角フラスコに入れ、70% エタノール 1 分、10% さらし粉濾液 30 分、200 倍希釈逆性石鹼液 2 分に攪拌しながら順次浸し、続いてアイソレーターのジャーミサイドトラップ中の殺菌液(200 倍希釈逆性石鹼液)に 2.5 分おいた後アイソレーター内に移した。滅菌水で種子を 5 回洗浄し菌検定用培地・BCP 加プレートカウントアガール (pH 6.5 に調製)²⁾を 20ml 含む 3×10cm の試験管にコムギ種子の腹が下になるように 1 粒ずつ播種し、アルミフォイルのふたをした。

(2) 菌検定および幼植物の選定：菌の汚染がみられたり、発芽しない種子はアルミフォイルの蓋をしたままジャーミサイドトラップを通じて棄却した。そして順調に生育したもののみ蓋をとり、播種後 8 日間菌検定培地で栽培した。最終的には PIMA, IAS とも菌の感染が認められずしかも生育の揃った物を 18 個体ずつ選り本栽培に供した。

(3) 移植および本栽培：上記の予備的な栽培で得たコムギ芽生えは、胚乳除去後、本栽培用のアイソレーター内へスリーブを通じ移した。1l 容の磁製ポットを用い PIMA, IAS ともポット当たり 4 本または 5 本植えとし水耕栽培を行った。対照としての非無菌栽培用のコムギ幼植物はこの無菌栽培用のアイソレーターよりいったん搬出し、滅菌していないアイソレーター内のポットに同

* 本報の概要は昭和 60 年度日本土壌肥料学会金沢大会で発表した。

** 東北大学農学部 (980 仙台市埴通雨宮町 1-1)

*** 同上 (現在、全国農業協同組合連合会農業技術センター 254 平塚市東八幡 5-5-1)

昭和 63 年 7 月 28 日受理

日本土壌肥料学雑誌 第 59 巻 第 6 号 p.601~606 (1988)

第 1 表 水耕液組成

要素	使用塩類	濃度 (mg/l)
N	NaNO ₃	28.0
P	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	18.6
K	K ₂ SO ₄	23.4
Ca	CaCl ₂ ·2H ₂ O	12.0
Mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O	14.8
Fe	FeSO ₄	2.5
B	H ₃ BO ₃	0.54
Mn	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.05
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02
Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Mo	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.01

様に移植した。2台のアイソレーターによる栽培はファイトトロン的人工光下で行い昼 14,000 lx, 22°C, 12 時間, 夜 18°C とした。

(4) 水耕液: 栽培に用いた水耕液の組成は第 1 表に示した。水耕液は, アイソレーター内においてオートクレーブ滅菌した各要素のストック液を滅菌水 1l に必要量加え調製した。硫酸第 1 鉄液はオートクレーブにより褐色沈殿を生じたので, よく攪拌しサスペンションの状態を加えた。コムギ幼植物を移植後, 水耕液の攪拌により 2 日後には鉄の沈殿は消失した。栽培期間中水耕液の更新は行わなかったが, 窒素だけは移植後 10 日目に各ポットに初めと同量追加した。

(5) 無菌の確認: アイソレーター内に搬入しておいた細菌用の TGC, 乳酸菌用の BCP 加プレートカウントアール, および真菌用のツァベックドックスの各菌検定培地 (いずれも日水製薬製) を用い, 綿棒でアイソレーター各所, 器材等を拭き取り各培地に塗布した後テープで密封し, ジャーミサイダルトラップより搬出し 30°C の恒温器に入れ検定した。同様に水耕液の菌検定も移植時と 6 日目に行った。

(6) 生育の測定: 移植後 16 日間を通じて, 経時的に草丈を測定した。また試料採取時には, 地上部と根に分けて新鮮重を計り, 葉齢も調べた。

3) 根分泌物の分析

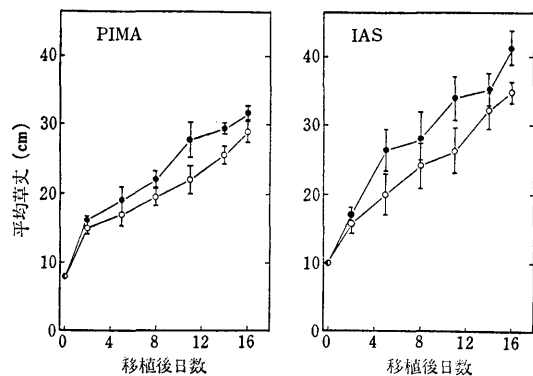
(1) 試料の調製: 水耕液は, pH を測定し, 孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過し, 脱落根あるいは菌体 (非無菌栽培) を除いた後, -15°C で保存して分析試料とした。水耕液全量をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し, 終濃度が 75% になるように無水エタノールを加えた。遠心分離により沈殿物を除いた後, 上清は再び減圧下に蒸発乾固した。これに少量の蒸留水を加え再溶解し再び遠心分離しその上清をイオン交換樹脂

に通して塩基性, 中性, 酸性の 3 画分に分けた。すなわち, カチオン交換樹脂, Dowex-50(w) のカラムを通し塩基性画分を, さらに, アニオン交換樹脂, Dowex-1 を通して中性画分と酸性画分をそれぞれ分離した³⁾。

(2) 定量分析: 塩基性画分における全遊離アミノ酸量は, ニンヒドリン反応による比色法により⁴⁾, 各成分アミノ酸量は高速液体クロマトグラフィー (AApak カラム, JASCO 製) で分離, ニンヒドリン比色法によった。中性画分における全糖量は, アンスロン硫酸法⁵⁾ により定量した。各糖の定量法は Bio-Gel P-2 によるゲル濾過ならびにペーパークロマトグラフィー (展開材, ブタノール: ピリジン: 水=6:4:3.5, 2 回展開) で分離, フェノール硫酸法による比色法で行った⁶⁾。なお, 分離溶出液の加水分解は 2 N HCl, 100°C, 4 時間で行った。酸性画分における全酸性物質は滴定により, 各有機酸の定量は高速液体クロマトグラフィー⁷⁾ で分離し, 紫外外部吸収によりそれぞれ測定した。なお, 水耕液中の根分泌物の分析は 4 本植えと 5 本植えのそれぞれについて行ったが, 両者の分析値ともほぼ同様な傾向を示したので 4 本植えの結果のみを示した。

3. 結果および考察

草丈の経時的变化を第 1 図に示した。PIMA ならびに IAS とも非無菌栽培のものに比べ, 無菌栽培のものの方が明らかに生育が良好であった。すなわち新鮮重で比べてみると, PIMA, IAS とも無菌栽培のものが地上部で約 70%, 根部で約 40% も非無菌栽培に比べて上回っていた。さらに, 葉齢も両品種とも無菌栽培のものの方が 0.3 葉ほど進んでいた (第 2 表)。なお栽培終了時の水耕液の pH は (第 3 表), 両品種とも無菌栽培のもの



第 1 図 無菌環境と非無菌環境下で栽培した PIMA ならびに IAS の平均草丈の経時的变化

●, 無菌栽培; ○, 非無菌栽培. 縦棒は標準偏差を示す。

第2表 PIMA, IASの無菌ならびに非無菌水耕栽培における生育

品種	栽培条件	新鮮重 (g/個体)		葉齢
		地上部	根	
PIMA	無菌	0.89±0.12 (100)	1.00±0.12 (100)	4.1
	非無菌	1.55±0.23 (174)	1.37±0.21 (137)	4.4
IAS	無菌	1.25±0.26 (100)	1.15±0.23 (100)	3.9
	非無菌	2.13±0.30 (170)	1.69±0.23 (147)	4.2

()内の数字は、無菌栽培区の生育に対する割合(%)を示す。

第3表 水耕終了時における水耕液のpH

	PIMA		IAS
	無菌栽培	1) 6.85 2) 6.88	6.85 6.90
非無菌栽培	1) 6.50 2) 6.62	6.59 6.70	

- 1) ポット当たり4本植え。
2) ポット当たり5本植え。

ののほうが、非無菌栽培のものに比べ、若干高めの傾向を示した。しかしPIMAとIASの両水耕液間に著しいpH差は認められなかった。

このような無菌栽培における生育が非無菌栽培におけるものより上回っている原因として、①無菌環境下では、微生物との栄養の競合がないこと、②非無菌環境下では、微生物からの生長阻害因子が抑制的に働くこと、③無菌環境下で、いったん放出された分泌物質が微生物に分解されないため、これを再吸収して再び生長に利用しうることなどが考えられる。

BOWEN・ROVIRA⁸⁾によれば、クローバーやトマトでは無菌栽培と非無菌栽培で、生育の差は認められなかったが、LINDSEY⁹⁾によればインゲンでは無菌栽培のほうが乾物重でも、草丈でも生育が劣ったという。このように無菌栽培と非無菌栽培の生育比較に関しては、植物種や栽培条件によって異なった結果が報告されている。この生育の差が何に由来しているのかは、先に述べたこと以外にも数多くの要因が複雑に影響を及ぼしあった結果であり、今後の課題とされよう。

水耕液の全遊離アミノ酸、全糖、全有機酸の各含量は第4表に示した。PIMA, IASとも各成分量は、無菌栽培のもののほうが圧倒的に多く、その傾向は全糖で顕著であった。次に無菌栽培によって得られた水耕液に含まれる各画分について遊離アミノ酸、糖および有機酸の

第4表 水耕液中の全遊離アミノ酸、全糖、および全有機酸量

画分	PIMA		IAS	
	非無菌	無菌	非無菌	無菌
アミノ酸 ($\mu\text{mol}/\text{個体}$)	0.12	1.17	0.93	1.82
糖 ($\mu\text{mol}/\text{個体}$)	0.10	1.19	0.07	0.86
有機酸 ($\mu\text{eq}/\text{個体}$)	1.8	4.0	3.3	5.0

第5表 塩基性画分における遊離アミノ酸組成

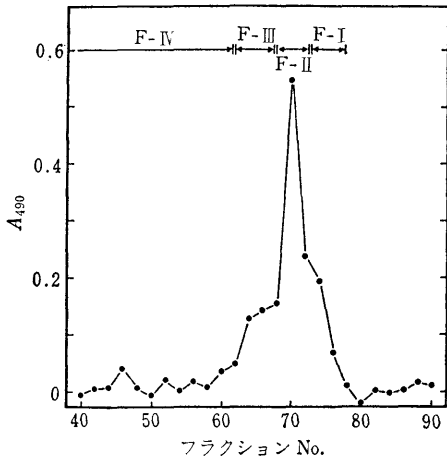
アミノ酸	mol %	
	PIMA	IAS
アスパラギン酸	13.0	12.9
グルタミン	5.3	2.5
スレオニン+アスパラギン	7.1	9.4
セリン	15.7	20.6
グルタミン酸	24.6	18.5
グリシン	7.4	9.7
アラニン	9.3	16.3
シスチン	0.7	ND*
バリン	2.5	2.8
メチオニン	ND	ND
イソロイシン	2.1	1.4
ロイシン	2.7	1.8
タイロシン	1.7	0.6
フェニルアラニン	4.8	1.9
ヒスチジン	0.5	0.3
リジン	1.4	0.9
アルギニン	0.9	0.4

* 検出されず。

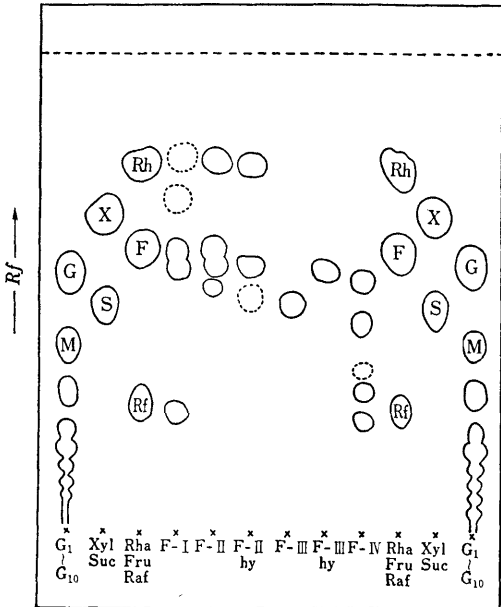
組成をそれぞれ調べた。第5表に、遊離アミノ酸組成を示す。PIMA, IASとも、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニンが多く、これら5種類で全体の70%以上を占めた。なお両品種間にアミノ酸組成の大きな違いは認められなかった。

糖については、無菌栽培のPIMAのゲル濾過による溶出パターンを第2図に示した。フラクションナンバー70付近の大きなピーク(F-II)を中心に、図のように低分子側から順にF-I, F-II, F-IIIそして最も高分子側のピークをF-IVとした。F-IIとF-IIIは、それぞれ二糖類および三糖類と考えられるので一部を加水分解しペーパークロマトグラフィーに供して分析した結果が第3図である。

F-IならびにF-IIにフラクトースとグルコースの強いスポットが認められた。また、F-IIIはショ糖のスポットのみが認められた。F-IIの加水分解物、すなわちF-II hyは、ちょうどF-IIからフラクトースだけが抜



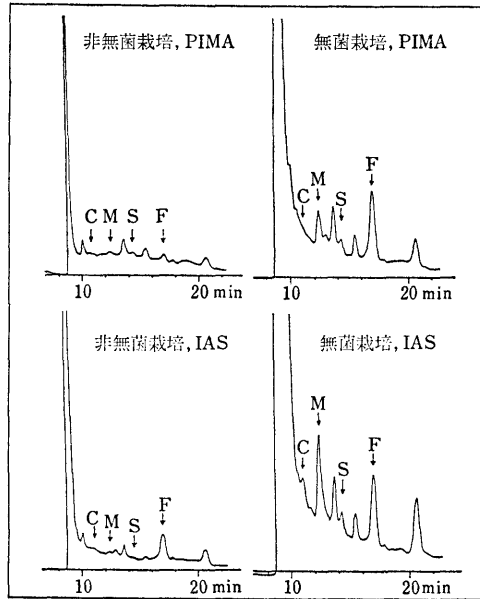
第 2 図 水耕液中の糖のゲル濾過による溶出パターン
カラムサイズ, 1×60cm; 溶媒, 水; 温度, 45°C;
1 フラクシオン, 0.5ml.



第 3 図 無菌栽培した PIMA の水耕液中の糖の
ペーパークロマトグラム

G₁~G₁₀, 重合度 1~10 の糖類;(G), グルコース;(M), マルトース; Suc(S), スクロース; Xyl(X), キシロース; Rha (Rh), ラムノース; Fru (F), フラクトース; Raf (Rf), ラフィノース.

けたようになっていた. F-III を加水分解した F-III hy はグルコースのスポットのみが認められた. そのほか, F-I と F-II には, ラムノース, キシロース, ラフィノース等の移動度(Rf)に相当のものが認められた. また, F-IV には多糖類と思われるスポットが認められた.



第 4 図 培地中の有機酸の HPLC における溶出パターン
C, クエン酸; M, リンゴ酸; S, コハク酸; F, フマル酸

第 6 表 PIMA ならびに IAS の根から水耕液中に
放出された有機酸量 (無菌栽培)

有機酸	PIMA ($\mu\text{mol}/\text{pot}$)	IAS ($\mu\text{mol}/\text{pot}$)
クエン酸	ND*	0.12
リンゴ酸	0.73	1.69
コハク酸	0.47	0.70
フマル酸	0.08	0.08

* 検出されず.

以上から, F-I と F-II はともに単糖類であり, F-III が二糖類, これらに比して F-IV にはより以上の重合体が含まれていることがわかった. 先のゲル濾過の溶出ピークの面積から糖量を比較すると, ほとんどが単糖類 (F-I と F-II) と二糖類 (F-III) であり, その比は, 単糖類:二糖類=4:1 であった.

以上の結果は PIMA のものであるが, IAS もまったく同じ様相を示した.

有機酸の高速液体クロマトグラフィーによる溶出パターンを第 4 図に示した. 非無菌栽培のものは, ほとんどピークが認められなかったが, 無菌栽培のものでは, クエン酸, リンゴ酸, コハク酸, フマル酸に相当の有機酸が認められた. PIMA と IAS を比較すると, リンゴ酸だけが IAS で比較的多量に放出されており, PIMA の 2.3 倍も多かった(第 6 表). なお北川ら¹⁰⁾も, 非無菌条件下における水耕栽培ではあるが, Al 耐性のコムギ品種が

感受性のものよりリンゴ酸をより多く水耕液中に放出することを認めている。

以上根分泌物質全体を通じて、3画分とも無菌栽培のものの方が圧倒的に多かったが、これは非無菌栽培条件下では分泌物質が微生物によって速やかに分解されるためと考えられる。このことは、比較的長期間の水耕栽培で根分泌物質を調べようとするとき、無菌栽培が大変有効な手段であることを証明している。非無菌条件下に栽培して根分泌物質を回収するとしたら、1～2日間という短期間の水耕栽培にするか、根にたえず水耕液を滴下しつづける方法など、微生物に分解されないうちに回収する方法が考案されねばならない。しかしその操作の煩雑さや特殊な栽培条件が植物に与える影響などを考えるとこれらの方法にも問題がある。

無菌栽培のほうが、非無菌栽培より根分泌物質が多かったというのは、先に述べたように無菌環境下では、分解されずに集積していたということであり、根から分泌された物質の積算量が非無菌環境下でのそれより多かったという意味ではない。そういう意味ではむしろ菌の存在により、根分泌物質中の有機酸やタンパク質が増加したというマリーゴールドを使った報告¹¹⁾もある。また、根からの分泌を促進させる働きをもつ微生物代謝産物、たとえば、polymixin, penicillin¹²⁾, victrin¹³⁾, そしていくつもの酵素^{14,15)}も知られている。

このように、自然条件下の根圏では種々の生物との複雑な相互作用により植物の生育が営まれているわけで、これら個々の因子の植物への影響を解析するためにも、無菌栽培は有効な実験手段といえる。

さて、コムギ2品種 PIMA, IAS の根分泌物質を比較してみると、遊離アミノ酸と糖の組成に関しては、両品種間に大きな違いは認められなかった。遊離アミノ酸は、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニンが多かった。糖は、ペーパークロマトグラフィーの結果、数多くのスポットが検出されたが、糖の大部分を占めるのはグルコースとフラクトースを中心とする単糖類で、次いでショ糖であった。なお、F-III hy において、加水分解でフラクトースのスポットが消えたのは、これが酸による分解を受けたためと考えられる。注目すべき点は、糖成分に違いが認められなかった両品種において、有機酸では違いが認められ、とくにリンゴ酸が IAS で PIMA より比較的多量に存在したことである。リンゴ酸がキレート能をもつ物質であることと、IAS がアルミニウム耐性の品種であることから、このリンゴ酸がコムギのアルミニウム耐性の機構に何らかのかわりをもつことが予想される。しかし、リンゴ酸の量

は、ポット全体で約 $2 \mu\text{mol}$ にすぎない。したがってアルミニウム濃度が m mol/l のオーダーまで耐性が認められる IAS において、リンゴ酸が直接アルミニウムをキレート化することによって、その障害を軽減するという考えは量的関係から今のところ納得しがたい。しかし、アルミニウム共存のストレス下では、もっと多量にリンゴ酸を放出するのかもしれない。この点については現在検討中である。

4. 要 約

アルミニウム耐性を異にするコムギ2品種(感受性 PIMA, 耐性 IAS)を実験材料として、ビニールアイソレーター方式による無菌栽培を行った。栽培は発芽8日後の芽生えを水耕法で16日間行い、培地中に放出された根分泌物質を非無菌栽培のものを対照として調べた。

生育は、草丈、新鮮重、葉齢いづれをみても無菌栽培のほうが良好であった。根分泌物質も無菌栽培の水耕液中に多量に集積していた。2品種 PIMA と IAS の根分泌物質で比較すると、遊離アミノ酸と糖には差は認められないが、リンゴ酸だけは IAS が PIMA に比べ多量に放出されていた。このことから、アルミニウム耐性の機構におけるリンゴ酸の関与が示唆された。

謝 辞 本研究に際し、コムギ種子入手ならびに糖分析について、それぞれご援助いただいた、千葉大学園芸学部吉田富男教授ならびに弘前大学教育学部加藤陽治助教授に感謝の意を表します。本研究は一部文部省科学研究費(課題番号62304019)の援助を受けた。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 藤原彰夫・門脇 信・小島邦彦・佐々木瑞雄・大平幸次：無菌高等植物に関する研究(第1報)、栽培装置の改修および二十日大根の無菌水耕栽培、土肥誌、**46**, 94～98 (1975)
- 2) 佐々木瑞雄・門脇 信・藤原彰夫：無菌幼植物の選抜について、同上、**48**, 569～570 (1977)
- 3) CANVIN, D. T. and BEEVERS, H.: Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean, kinetics and pathway. *J. Biol. Chem.*, **236**, 988～995 (1961)
- 4) 千谷晃一・矢追義人：ペプチドの分画法、蛋白質 核酸 酵素、**10**(3), 250～310 (1965)
- 5) 福井作蔵：還元糖の定量法、p.47～54, 学会出版センター、東京 (1979)
- 6) 中村道徳・貝沼圭二編：生物化学実験法 19. 澱粉・関連糖質実験法、p.225～269, 学会出版センター、東京 (1986)
- 7) OJIMA, K. and OHIRA, K.: Release of citric acid into the medium by aluminum-tolerant carrot cells. *Plant Cell Physiol.*, **25**, 855～858 (1984)

- 8) BOWEN, G.D. and ROVIRA, A.D. : Effects of microorganisms on plant growth. I. Development of root and root hairs in sand and agar. *Plant Soil*, **15**, 166~188 (1961)
- 9) LINDSEY, D. L. : Growth of beans, tomatoes, and corn under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, **57**, 960~964 (1967)
- 10) 北川貴子・森下豊昭・橋 泰憲・生井兵治・大田安定 : コムギのアルミニウム抵抗性の品種間差異と有機酸分泌, 土肥誌, **57**, 352~358 (1986)
- 11) HAMEED, K. and COUCH, H.B. : Effects of *Penicillium simplicissimum* on growth, chemical composition, and root exudation of axenically grown marigolds. *Phytopathology*, **62**, 669 (1971)
- 12) NORMAN, A.G. : Microbial products affecting root development. Trans. 7th Congr. Int. Soil Sci. Soc., Wisconsin, Vol. 2, p.531~536 (1960)
- 13) WHEELER, H. and BLACK, H.S. : Change in permeability induced by victorin. *Science*, **137**, 983~984 (1962)
- 14) LAI, M., WEINHOLD, A.K. and HANCOCK, J.G. : Cell permeability increase in mung bean during infection by *Rizoctonia solani*. *Phytopathology*, **56**, 886 (1966)
- 15) SUBBA-RAO, N.S. and SARMA, K.S.B. : Pectin methyl esterase activity of root exudates of legumes in relation to rhizobia. *Plant Soil*, **28**, 407~411 (1968)

Characterization of the Root Exudates in Germfree Water Culture of Wheats

Mizuo SASAKI, Eiji FUJISAWA, Kunihiko OJIMA and Koji OHIRA

(*Fac. Agric., Tohoku Univ.*)

Aluminum-tolerant (IAS) and Al-sensitive (PIMA) varieties of wheat seedlings were grown for 16 days under the germfree culture conditions without Al supply. Amounts of organic acids, amino acids, and sugars which were excreted from roots into the media were compared between these varieties grown under either the germfree or conventional culture conditions.

Large amounts of the root exudates were detected in the media obtained from the germfree culture but not from the conventional conditions. The germfree-grown seedlings showed better growth than the conventional seedlings with both varieties. The amounts of amino acids and sugars excreted from IAS were of similar levels compared to these from PIMA. There were large amounts of malate among the organic acids excreted from IAS; malate excretion from IAS was 2.3-times higher than from PIMA. One of the characteristics of Al tolerance could be related to the potential of malate excretion.

Key words aluminum tolerant, germfree culture, organic acids, root exudates

(*Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **59**, 601-606, 1988)