

1. 研究大課題名 : 植物のアルミニウムストレス耐性機構
 研究中課題名 : IV. 酸性/アルミニウムストレス下の水耕栽培における大麦種子根、
 冠根の異なる応答機構
2. 研究機関 : 農林水産省九州農業試験場育種工学研究室
3. 研究者 : 斎藤 彰
4. 研究協力者 : 正岡 淑邦 (農林水産省九州農業試験場生産環境部)
 佐藤 和広 (岡山大学資源生物科学研究所大麦・野生
 植物資源研究センター)

5. 研究期間 : 平成7年度~平成11年度

6. 要約

多くの植物は酸性土壌でイオン化するアルミニウムにより葉と根に生育阻害を受ける¹⁾。水耕栽培実験系によって、酸性度は根の生育に影響を与えず、アルミニウムが根の伸長を阻害し、葉はその2次的結果であるとされた³⁾。小麦ではヘマトキシリンで種子根のアルミニウム存在部位を染める方法が育種選抜に利用されている。本研究では、ヘマトキシリン染色法は大麦に適応できないことを明かにした。また精密pHコントロール水耕装置を用いて、酸性/アルミニウムストレスを酸性度の影響とアルミニウムの影響に分け、それらに対する葉の発芽と伸長応答また根を種子根と冠根に分けて検討し、それらのストレスは発根と伸長に対して異なった応答をすることを明らかにした。10大麦品種を用いてそれらの応答を比較した結果、酸性ストレスに対する応答は、種子根と冠根では異なり、またアルミニウムストレスに対する応答は酸性ストレス応答と異なった。さらに出芽(根)と伸長に関する応答も異なることが明らかになった。すなわち、酸性/アルミニウムストレス耐性機構は複雑で少なくとも8遺伝子が関係すると推定した。

7. 研究目的

従来コムギの酸性土壌耐性品種はその発芽後初期生育期まで種子根を酸性水耕栽培し、種子根をヘマトキシリン染色して染まらないものを早期育種選抜してきた³⁾。それらの多くは酸性土壌栽培での収量増に反映していた⁴⁾。一方大麦の酸性土壌耐性品種の育種選抜においても、コムギと同様な早期選抜法が試みられているが実用化に至っていない。すなわち、大麦の酸性土壌耐性機構を解明するためには、すでにコムギで多くの研究から得られた定説を再検討する必要があると考えられた。そこで本研究では、従来の水耕栽培実験系以上に精密にpHをコントロールし、酸性ストレスとアルミニウムストレスに対する応答を個別に、また根を種子根と冠根に分けて解析し、さらに品種や発育時期も考慮して酸性/アルミニウム耐性機構を明らかにすることを目的とした。

8. 材料と方法

大麦品種 :

水耕栽培と土壌栽培で評価されているアルミニウム耐性品種 Dayton とアルミニウム感受性品種 Kearney⁴⁾、2) 種子根のヘマトキシリン染色法³⁾で評価されているアルミニウム耐性

品種 Dayton, Smooth Awn 203, Smooth Awn 86, Murasaki Mochi, Sunrise, Nakao Wase, Colonial 2, CI8411⁵⁾, 3) オーストラリア酸性土壌で育種された酸性土壌(アルミニウム)耐性品種 Brindabella は米国農務省遺伝資源コアコレクションから分譲して戴いた。また4) 大麦分子地図に用いられた、Step toe, Morex, Harrington, TR306 は Kleinhof 博士から分譲され⁶⁾、5) 大麦分子地図作成に用いた Ishukushirazu, KoA, Mokusekko 3⁷⁾ を用いた。

1) 発芽同調検定:

種子を種子消毒液(ベンレートT)に一晩 20°C で浸種し、水分をしみ込ませたシャーレ内濾紙に 24 個体置き 20°C で発根、発芽させ、実体顕微鏡で経時的に観察した。形態的に生育ステージを次のように定義した(Fig. 1)。

ステージ0: 浸種後形態的变化なし

ステージ1: 発根予定部位に白いスポット

ステージ2: 白いスポットが第一種子根(主根:S1)として発根する

ステージ3: 主根の両脇から第2,3種子根(S2、S3)が同調して発根する

ステージ4: 発芽

ステージ5: 主根の上部、発芽の下部より第4の種子根(S4)が発根する

ステージ6: 発芽の左右順不動で第5の種子根(S5)が発根する

ステージ7: S5の逆側に第6種子根(S6)が発根する。

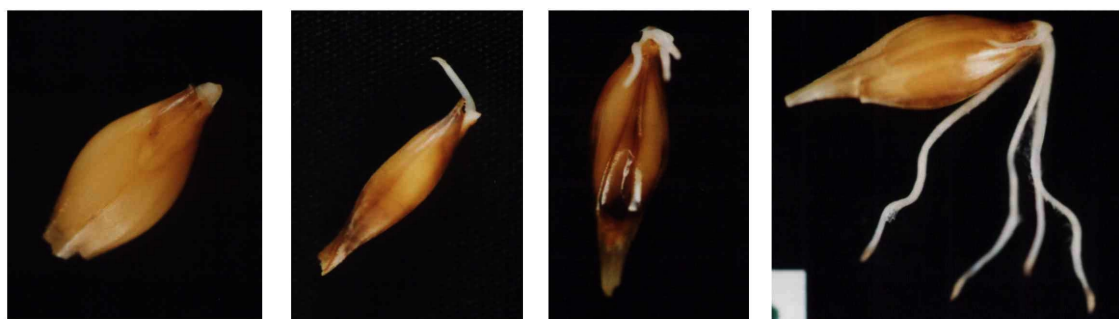


Fig. 1 Developmental figures of barley leaves, primary root, and crown roots
From left side: Stage 1, Stage 2, Stage 3, and Stage 5:

2) 種子根のヘマトキシリン染色:

オオムギ発根ステージ3以後の種子根初期生育期(ステージA; 24 hr)に対する酸、アルミニウムの影響を検討するために、常法³⁾に従いヘマトキシリン染色を以下のように行った。

1本の主根(S1)、2本の種子根(S2,S3)が発根したステージ3(0hr)の種子3個体をリン酸塩を除いたpH6.0の簡易水耕培養液(4 mM CaCl₂, 6.5 mM KNO₃, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM (NH₄)₂SO₄, 0.4 mM NH₄NO₃)に24時間水耕し(24hr)、さらに酸性に順応させるためにpH4.0の同水耕倍溶液で24時間水耕する(48hr)。その後0 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM, 60 μM, 90 μMのAlCl₃を含む同培養液(pH4.0)で24時間水耕し(計72hr)、30分水洗後

0.2%ヘマトキシレンで染色、30 分水洗し実体顕微鏡で観察した。各アルミニウム濃度に対して3個体を用い、1個体が持つ複数の種子根の内1本でも種子根が染色されないときその個体を耐性とし、全部が染色された時感受性とした。さらに1品種の3個体のうち1個体でも耐性のとき、その品種は耐性とした。

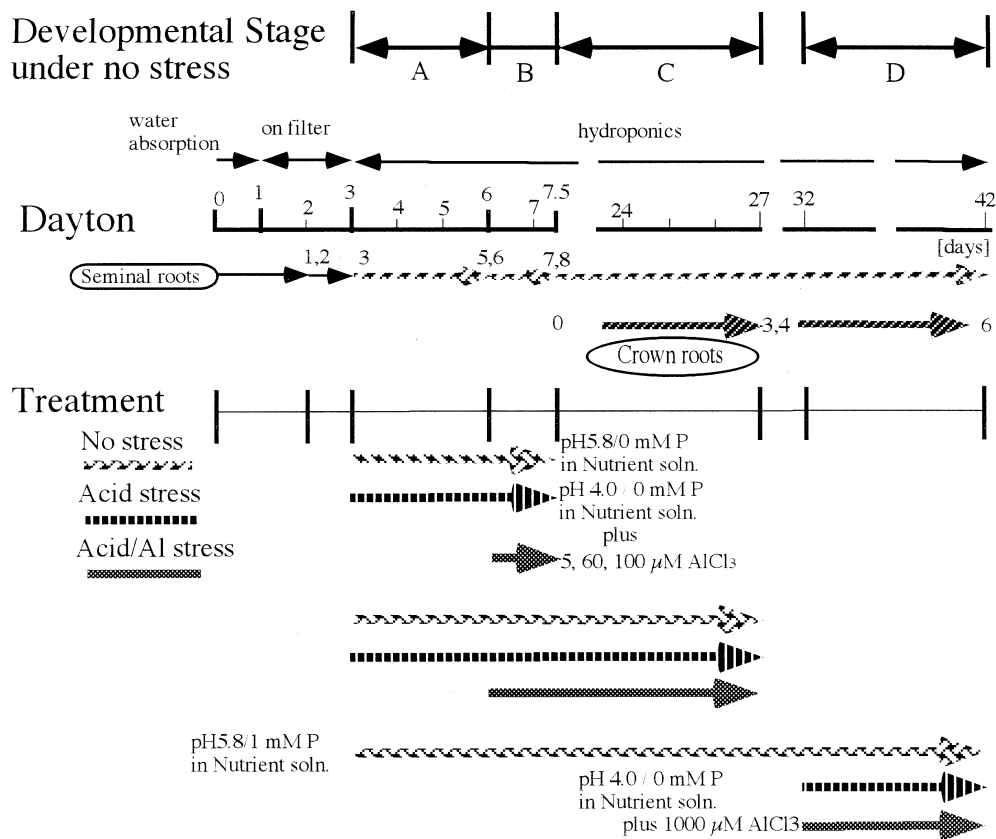


Fig. 2 Developmental stage of barley roots and the treatments of stress conditions

水耕栽培（大麦根の発生ステージとストレス処理条件は Fig. 2 に示した）：

3) 発根ステージ3以降の種子根後期生育期（ステージ B; 36 hr）に及ぼす酸性/アルミニウムストレスの影響を検討：

アルミニウム耐性品種 Dayton と感受性品種 Kearney を1%次亜塩素酸で30分消毒後1晩吸水させ、水分を浸み込ませたシャーレ内ろ紙上で約2日間4本種子根（主根，側根1~3）を発根させた（発根ステージ3）。その後実験区当たり6粒の発根した種子をpHコントローラーでpHを4.0にしたリン酸無添加の栄養水耕液（1 mM CaNO_3 , 0.35 mM MgSO_4 , 10 μM FeSO_4 , 9.5 μM H_3BO_4 , 0.765 μM ZnSO_4 , 0.1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$, 0.157 μM CuSO_4 , 3.6 μM MnCl_2 ）で3日間生育させた後、 AlCl_3 を最終濃度0, 5, 60, 100 μM になるよう添加し、さらに36時間生育させた。30分水洗後、0.2%ヘマトキシレンで染色、30分水洗後実体顕微鏡下で各種の種子根（S1, S2~S9）の染色を観察し、また各種子根を実体顕微鏡下で種子より切断しその根数，根長，根重，発芽した葉の長さ，重さを測定した。

4) 発根ステージ3以降の種子根後期生育と冠根生育初期(ステージC)に及ぼす酸性/アルミニウムストレスの影響を検討: 前述したアルミニウム耐性 Dayton, 感受性 Kearney とその他8品種をろ紙上でステージ3まで発根させ、3日間前述のリン酸欠水耕溶液 pH4.0の酸性ストレス条件で生育させ、4日目以降さらにアルミニウムストレス(最終濃度 0, 5, 60, 100 μM)を21日間与えた。無ストレス条件でこの21日間(ステージC)では冠根が3, 4本発根した。

5) 種子根後期生育と冠根後期生育期(ステージD; 10 days)に及ぼす酸性/アルミニウムストレスの影響を検討:

アルミニウム耐性品種 Dayton, 感受性品種 Kearney を第4, 5葉期(ステージD)まで昼25°C, 夜19°Cの温室でpHコントローラーでpH4.0一定にした完全培養液(3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 0.5 mM K_2SO_4 , 9.25 μM H_3BO_4 , 0.765 μM ZnSO_4 , 0.1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.157 mM CuSO_4 , 3.6 μM MnCl_2 , 67.5 μM Fe-EDTA)で生育させた(9本の種子根はひげ根を持つ)後、リン酸欠乏培養液(0.1mM NaH_2PO_4 以外は完全培養液と同様)に100 μM , あるいは1000 μM の AlCl_3 を加えたアルミニウム培養液で8あるいは10日間生育させ、地上部(葉鞘の無い葉, 葉鞘のある葉), 根部(ひげ根を持つ種子根, ひげ根を持たない冠根)の生重, 葉身, 葉鞘, 種子根, 冠根の長さを測定した。また根部をヘマトキシリン染色した。またアルミニウムによるとみられる葉の障害を観察した。

9. 結果

1) 第1種子根(主根)、続いて同調的に発根する第2,3種子根が確認できるステージ3に達する時間は品種で異なるが、その多くはろ紙で発根させてから84時間後に最も同調性が高かった。このことから、ろ紙で発根させてから84時間後にステージ3に達した個体を選抜した。

Table 1. 大麦発根生育期におけるステージ3の同調性

(N=24, seeds number 'n' at stage 3; synclonized rate = $n/N \times 100$)

		<u>24hr</u>	<u>48hr</u>	<u>84hr</u>
酸性土壌耐性品種	Brindabella	4.1	41.6	<u>83.3</u>
アルミニウム耐性品種	Dayton	4.1	70.8	<u>87.5</u>
	Smooth203	25.0	<u>70.8</u>	70.8
	Smooth86	12.5	<u>75.5</u>	54.1
	Murasaki	0	50.0	<u>70.8</u>
	Sunrise	4.1	<u>58.3</u>	50.0
	Nakaowase	0	37.5	<u>91.6</u>
	Colonial2	0	20.8	<u>58.3</u>
	CI8411	0	4.1	<u>79.1</u>
アルミニウム感受性	Kearney	0	4.1	<u>79.1</u>

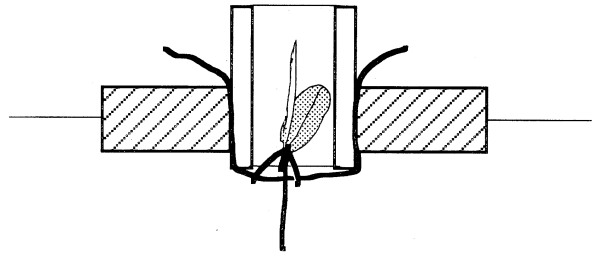


Fig. 3 Hydroponic system with pH controller and water circulator

2) オオムギ発根ステージ3以後の種子根初期生育期(ステージ A; 24 hr)に対する酸、アルミニウムの影響を、種子根のヘマトキシリン染色性で検討した。ステージ A では S1は伸長しないが S2、S3は伸長し、また新たに S4、S5や S6が発根、伸長する。各根端がヘマトキシレンで紫に染色されたか否か(アルミニウムが集積し、分裂/伸長活性を失ったか否か)を観察し、中性栄養培養液、酸性栄養培養液、あるいはアルミニウムの各濃度における実験区では3個体が持つ全ての根について観察し、その結果を Table 2、3 に示した。

Table 2 . ステージ A における S1 種子根の酸性/アルミニウムストレス応答
ヘマトキシリン染色性(染色+ : 非染色-)

		0	5	10	20	40	60	90 μ M
酸性土壌耐性	Brindabella	-	-	-	+	+	+	+
Al 耐性	Dayton	-	-	+	+	+	+	+
	Smooth203	-	-	-	-	+	+	+
	Smooth86	-	-	-	-	+	+	+
	Murasaki	-	-	-	-	+	+	+
	Sunrise	-	-	+	+	+	+	+
	Nakaowase	-	+	+	+	+	+	+
	Colonial2	-	-	+	+	+	+	+
	CI8411	-	+	+	+	+	+	+
Al 感受性	Kearney	-	-	+	+	+	+	+

Table 3 . ステージ A における S2-6 種子根の酸性 / アルミニウムストレス応答
ヘマトキシリン染色性 (染色 + : 非染色 -)

		0	5	10	20	40	60	90 μ M
酸性土壌耐性	Brindabella	-	-	-	+	+	+	+
Al 耐性	Dayton	-	-	-	-	-	-	+
	Smooth203	-	-	-	-	-	-	+
	Smooth86	-	-	-	-	+	+	+
	Murasaki	-	-	-	-	-	+	+
	Sunrise	-	-	-	-	+	+	+
	Nakaowase	-	-	-	-	+	+	+
	Colonial2	-	-	-	-	+	+	+
	CI8411	-	-	+	+	+	+	+
	Al 感受性	Kearney	-	-	+	+	+	+

(注) Brindabella の根はステージ 7 以上、その他はステージ 4 まで発根した。

3) 発根ステージ 3 以降のアルミニウム耐性 Dayton と感受性 Kearney の種子根後期生育期 (ステージ B, 36hr) に及ぼす酸性 / アルミニウムストレスの影響を検討した。その結果、酸性ストレス処理開始時(-72hr) : Dayton, Kearney は 1 葉が発芽し、その葉長、葉重に差がなかった(data not shown)。また、種子根の本数、長さやその根重についても両者に大きな差はなかった。しかし、

酸性ストレス 72hr 後: 酸性 / アルミニウムストレス処理開始 0hr \cdot 0 μ M Al で葉数は 1 で差がないが、葉長・葉重では Dayton が Kearney を上回り、葉の生育に関して Dayton は Kearney に比べ酸性耐性であった(data not shown)。

また、種子根の数 (Fig. 4A) \cdot 根長 (Fig. 4B) \cdot 根重 \cdot ヘマトキシリン染色されない (伸長できる) 根数 (Fig. 5A) とその長さ (Fig. 5B) とともに Dayton が Kearney を上回り、Dayton は Kearney に比べ酸性耐性であった。

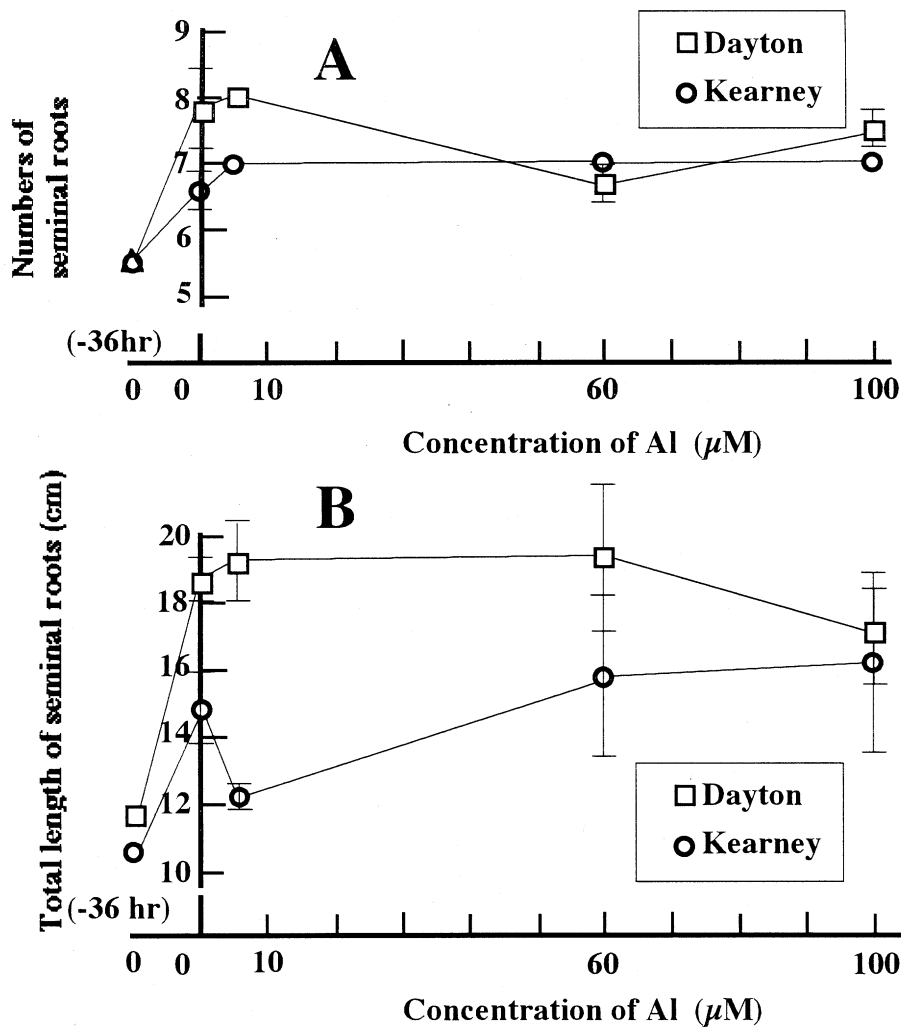


Fig. 4 Numbers and total length of seminal roots at different Al concentration for 36 hr

酸性/アルミニウムストレス 36hr 後：各濃度のアルミニウムストレス下では形態（葉数・葉長・葉重；data not shown, 根数・根長・根重）に大きな差がなかった(Fig. 4A, B)。またアルミニウムストレス処理 36 時間, Dayton と Kearney では新たに種子根が発根しないが, すでにある 5 ~ 6 本の種子根の内伸長できる根の根数とその長さについてヘマトキシリン染色評価はアルミニウム感受性と耐性品種に差を見いだした(Fig. 5A, B)。すなわち, Kearney は 5 μM 以上のアルミニウムストレス下, 全ての根がヘマトキシリン染色された（伸長できない状態である）のに対して, Dayton では 5 μM で 0 μM と同様に染色されない（伸長できる）種子根が存在していた。

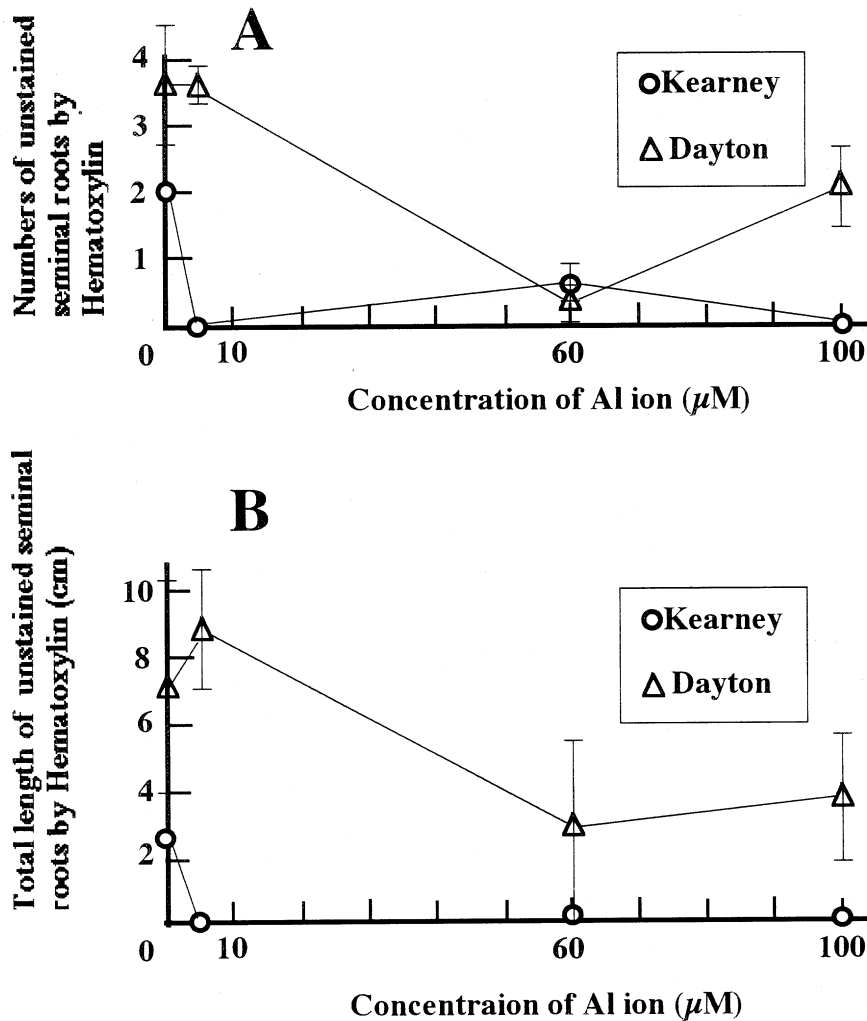


Fig. 5 Numbers and total length of unstained seminal roots by Hematoxylin at different Al ion concentration for 36 hr

4) 発根ステージ3以降の種子根後期生育と冠根生育初期(ステージC; 21 days)に及ぼす酸性/アルミニウムストレスの影響を検討: 冠根が出根・伸長する発生ステージCにおける「酸性ストレス下 pH4.0」と「酸性ストレス pH4.0/アルミニウムストレス下(5, 60 μM)」に分けて解析した。また「種子根」と「冠根」を実体顕微鏡下で分けて酸性ストレス, アルミニウムストレス下における障害を解析した。なお, ストレス応答の評価は正常条件(無ストレス条件 pH5.8, アルミニウム無添加)における根の本数や長さを1としたとき, 酸性, あるいはアルミニウムストレス下におけるそれらの値を示した。その結果、

(1) 種子根の出根能に対する酸性ストレス, アルミニウムストレス:

10品種の種子根が示す出根能は酸性ストレスに対して, 大きく影響されず, 品種間差も小さく, 酸性/アルミニウムストレスについても同様に品種間差が小さかった(Fig. 6A, B)。

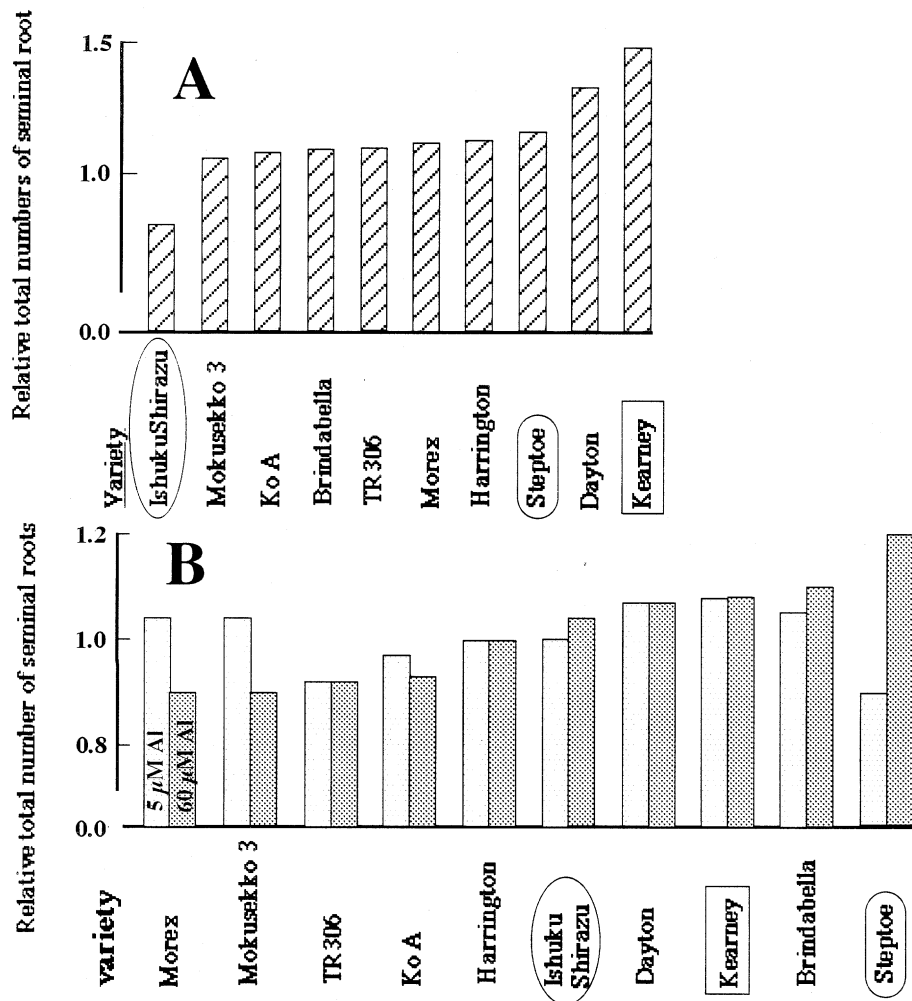


Fig. 6 Ability in emergence of seminal roots in (A) acid stress (pH4.0) and (B) Al stress (5, 60 μ M) vs. neutral condition (pH5.8), no Al stress (0 μ M) at stage C

(2) 種子根の伸長能に対する酸性ストレス，アルミニウムストレス

10 品種の種子根の伸長能は酸性ストレス，アルミニウムストレス両者に阻害された。その品種間差は有意に異なるが，酸性ストレスに耐性な KoA や Steptoe は，アルミニウムストレスには最も感受性であった(Fig. 7A, B)。

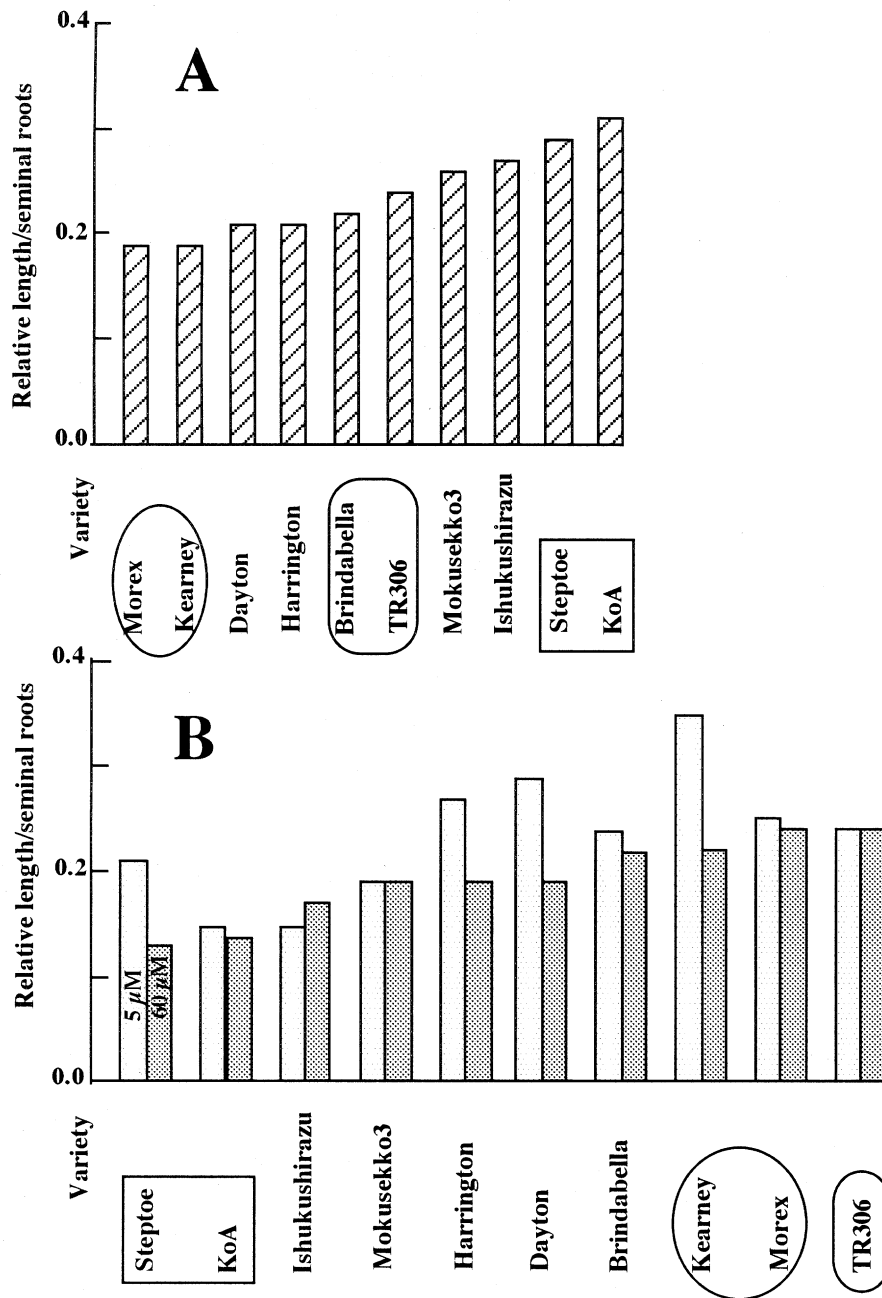


Fig. 7 Elongation ability of seminal roots in (A) acid stress (pH4.0) and (B) Al stress (5, 60 μ M) vs. neutral condition (pH5.8), no Al stress (0 μ M) at Stage C

(3) 冠根の出根能に対する酸性ストレス，アルミニウムストレス：

10 品種の冠根が示す出根能は酸性ストレスに促進され，Mokusekko3 では最大約 5 倍に達した。アルミニウムストレスに対しても促進されるがその程度は酸性ストレスより小さく，酸性ストレスでの促進が最も小さい Harrington や Morex がアルミニウムストレスでは最大値を示した(Fig. 8A, B)。

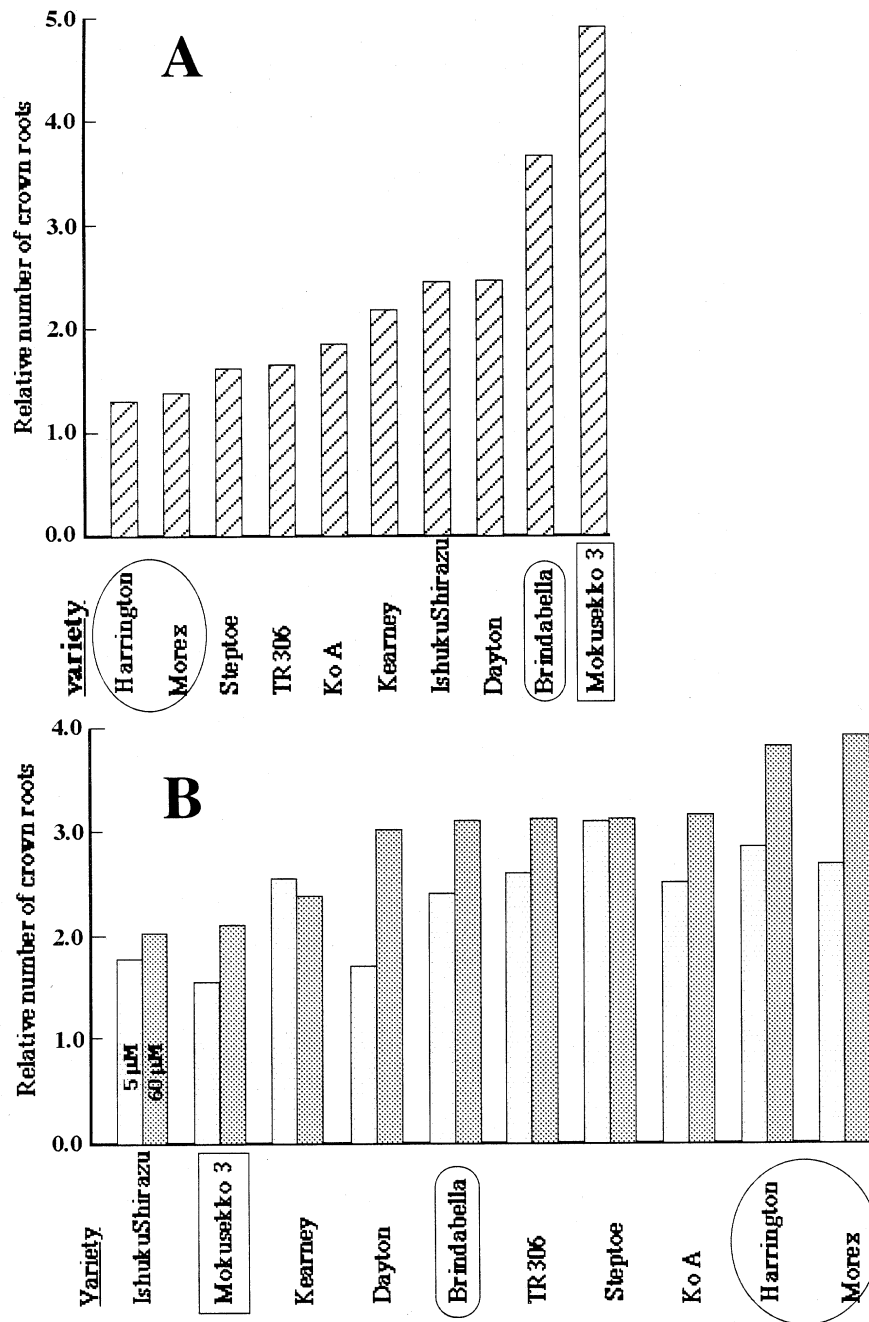


Fig. 8 Ability of emergence of crown roots in (A) acid stress (pH4.0) and (B) Al stress (5, 60 μ M) vs. neutral condition (pH5.8), no Al stress (0 μ M)

(4) 冠根の伸長能に対する酸性ストレス，アルミニウムストレス：

10 品種の冠根が示す伸長能は酸性ストレス，アルミニウムストレス共に阻害されるが，上記のようにその出根数が異なるため，冠根 1 本当たりの伸長として示した。すなわち酸性ストレスに対しては品種間差は大きく，Mokusekko3 は最小値約 0.1 を，Morex や TR306 は最大値約 0.4 を示した。一方アルミニウムストレスに対しては，Mokusekko3 は耐性の値（約 0.25）を Morex や TR306 は感受性の値（約 0.1）を示した(Fig. 9A, B)。

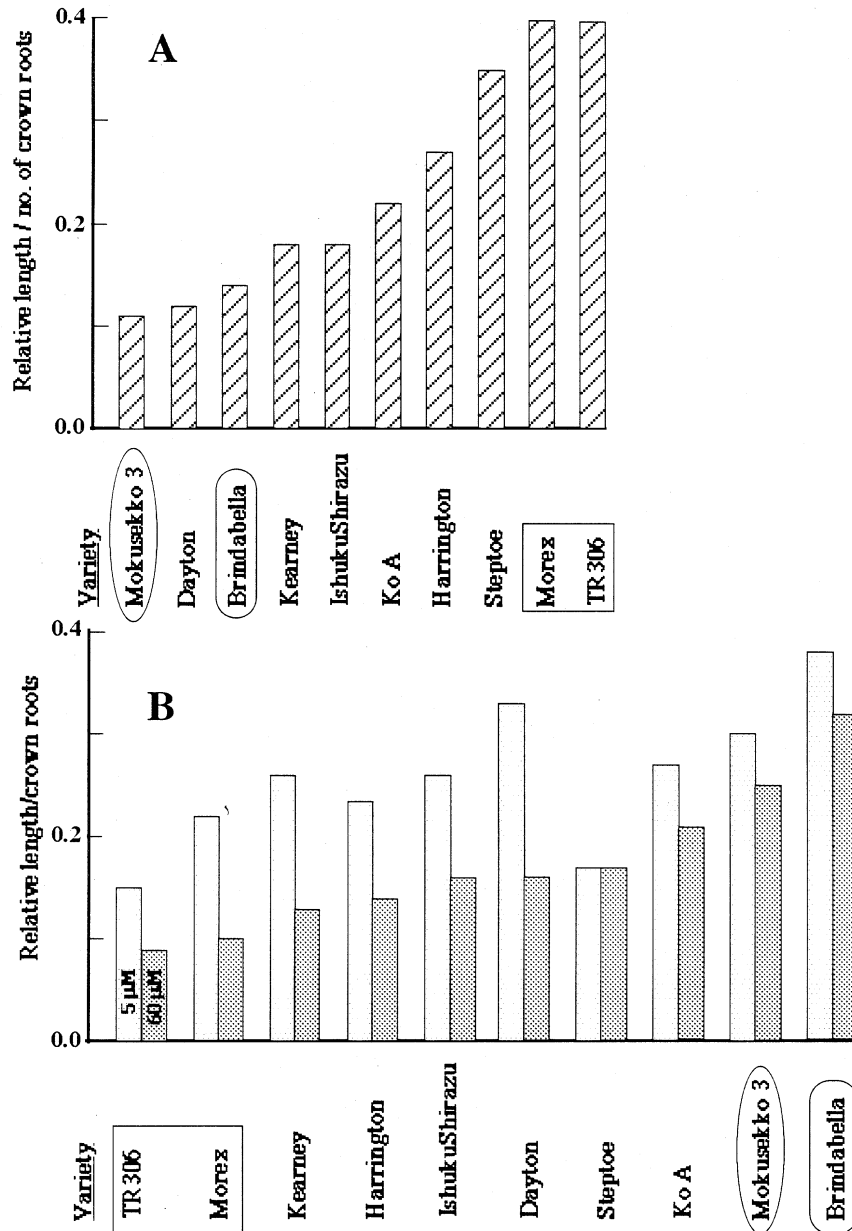


Fig. 9 Ability of elongation of crown roots in (A) acid stress (pH4.0) and (B) Al stress (5, 60 μ M) vs. neutral condition (pH5.8), no Al stress (0 μ M)

(5) 種子根後期生育と冠根後期生育期 (ステージ D の 10 日間) に及ぼす酸性 / アルミニウムストレスの影響を検討:

初期冠根の発根期からアルミニウムストレス処理し, 初期冠根とアルミニウム耐性の関連を明らかにするために, アルミニウムストレス処理直前までに種子根が十分に発根・伸長するようにカルシウムの濃度を 3 mM, リン酸濃度 1 mM とした。その結果, 両品種の種子根の根数・根長・根重について, アルミニウムストレス処理直前(pH5.8, 0 mM Al)と 10 日後の pH4.0, 0 mMAl の値はほぼ同様であった (data not shown)。アルミニウムストレスなしの値を 1 としてアルミニウムストレス下の値を Table 4 に表した。

Table 4 . pH4.0/ 1 mMアルミニウムストレスが大麥の根に及ぼす影響

アルミニウム感受性品種 Kearney						
Al mM	根重(g)		種子根		冠根	
	種子根 + 冠根	本数	全長(cm)	本数	全長(cm)	長さ / 本数
0	1.28	9	154.7	9	52.2	5.8
1.0	0.37	9	99.2	6	5.9	0.98
比	0.29	1	0.64	0.66	0.11	0.16
アルミニウム耐性品種 Dayton						
0	1.65	9	261.6	6.3	55.5	8.8
1.0	0.86	9	142.8	19.6	52.8	2.7
比	0.52	1	0.54	3.1	0.95	0.3

すなわち Kearney では 1 mM のアルミニウムストレス下で種子根の根数は 0mM と同様に 9 本であるが、その根長は 0mM に比べ 0.64 であった。また冠根の根数は 0mM に比べ 0.66 であり、その根長は 0.11 であった。一方 Dayton では 1mM のアルミニウムストレス下で種子根の根数は 0mM と同様に 9 本であるが、その根長は 0mM に比べ 0.54 であった。冠根について Dayton は Kearney と大きな差を示した。すなわち、冠根の根数は 0mM に比べ 3 倍の値を示し、その根長は 0.95 であった。このことから、アルミニウム耐性の Dayton では、感受性の Kearney に比べて 1mM のアルミニウムストレスに対して冠根の発根を促進し、伸長能耐性を示していると考えられた。

10 . 考察

1) 酸性 / アルミニウムストレスに対する大麥の葉や根の生育応答を検討するためには、生育がより同調した個体群 (品種) を用いることが重要である。本研究で用いられた品種は表 1 に示したように、濾紙で発根させてから 84 時間後にその多くがステージ 3 に達し、特に水耕栽培に供試した 10 品種は約 80% 以上の同調率を示し、さらに同調した個体を選抜し供試したことから、それらの生育は 100% 近く同調していると考えられた。

2) 従来へのマトキシリン染色の評価法³⁾ は定性的であり、一部染色度を 3 段階 (no staining, partial staining, complete staining) に分けアルミニウム耐性レベルを Very sensitive (VS), Moderate sensitive (MS), Moderately tolerant (MT), Tolerant (T) に格付けしているものもある⁵⁾。その格付けによれば、本研究でアルミニウム耐性品種は CI8411 が (MT) である以外はすべて (T) であり、感受性 Kearney は (VS) である。材料と方法で述べたように、種子根のマトキシリン染色性は二者択一ではなかった。すなわち、本研究では種子根の内主根 S1 は第 1 根として発根するが、その後発根する種子根 S2-6 のように伸長せず、またひげ根も形成しなかった。ある時点で伸長が停止すると考えられる主根 (S1) のアルミニウ

ムストレスに対するヘマトキシリン染色性を Table 2 に示した。Table1 と第 2 以降の種子根 (S2-) の染色性の結果 (Table 2) を比較すると、一定の相関は認められるが、Dayton で見られるように主根とその他種子根のアルミニウムストレス応答は異なることが推定された。また、本研究から Brindabella のアルミニウム耐性は (MT) と評価されたが、種子根の出根が他の品種に比べ多数であることは他と質的に異なると考えられた。このなお、表 2 の結果は前述の格付け⁵⁾ と大きく矛盾することはなかったが、種子根のヘマトキシリン染色性が種子毎に異なり明確な二者択一でないことから、大麦のアルミニウム耐性選抜には適さないと結論した。

従来酸性土壌での酸性 / アルミニウムストレスが及ぼす影響についての考察は、酸性 / アルミニウム条件下の水耕栽培で再検討されてきた。一方 pH 4.0 以下の条件下、根の細胞では +H⁺ イオンの害によって細胞膜が破壊され、K, Na, Mg などが漏出されるが、アルミニウムイオンが細胞膜に存在すると H⁺ イオン害を抑制する「VIETS 効果」が知られている⁸⁾。しかし、酸性土壌を用いた実験では酸性度の影響を検討することはできないことから、水耕栽培において酸性度の影響を検討することが少なかった⁴⁾。すなわち、従来の水耕栽培では土壌栽培と同様に、中性でアルミニウムストレスのない条件に対する酸性でアルミニウムストレスに対する応答反応を検討していた。また、形態的に異なる種子根・冠根についても、個別に解析した報告は非常に少ない⁹⁾。そこで、本研究における水耕栽培では大麦根を種子根と冠根に分け、またそれらの生育を 3 期、1] 種子根後期生育期 (ステージ A, B)、2] 種子根後期生育・冠根初期生育期 (ステージ C)、3] 種子根後期生育・冠根後期生育期 (ステージ D) に分けて解析した。さらに 2] については 10 品種を用いて、酸性ストレスとアルミニウムストレスを個別に検討した。その結果、

1] 種子根後期生育期 (水耕栽培開始後第 3~4.5 日) : 酸性ストレスに対して Dayton と Kearney の種子根の出根能に大きな差が認められないが、Kearney に比べ Dayton の伸長能は高かった。一方、5, 60, 100 μ M のアルミニウムストレスに対して Dayton と Kearney の種子根の出根能、伸長能ともに差がなかった (Fig. 1)。すなわち、種子根後期生育期におけるアルミニウムストレスに対する種子根伸長能は、従来のアルミニウム耐性、感受性 2 品種で差が認められなかった。これまで水耕栽培開始後第 18 日目において Dayton の最長根の伸長能は Kearney に比べアルミニウム耐性であると報告¹⁰⁾されていた。本研究では水耕栽培開始後第 3~4.5 日では Dayton の全種子根の伸長能が Kearney に比べアルミニウム耐性を示さず、むしろ酸性耐性を示すと結論した。またヘマトキシリン染色結果からは、Dayton は酸性条件で Kearney に比べ非染色性の種子根、すなわち今後さらに伸長する能力のある種子根の本数は多くその長さも長いことから酸性耐性であると結論した。さらにアルミニウムストレス条件でも Dayton は Kearney に比べアルミニウム耐性と結論した。

2] 種子根後期生育期と冠根初期生育期 (ステージ B, C の 21 日間) :
水耕栽培開始後 2 4 日目、発育ステージ B で種子根はほぼ出根が止まり伸長は継続する。一方、このころから冠根が出根し伸長し始める。本研究では Dayton, Kearney を含む大麦 10 品種を用いて、種子根の出根能、伸長能、冠根の出根能、伸長能の品種間差を検討した。その結果、酸性ストレス、アルミニウムストレスが種子根の出根能に及ぼす影響はほとんどな

く、また品種間差は小さかった (Fig. 3)。すなわち、最終的な種子根の本数を制御する出根能は酸性ストレス、アルミニウムストレスにตอบสนองしないと結論した。また、種子根の伸長能は酸性ストレス、アルミニウムストレスに対してすべて阻害された。しかし、酸性ストレスに関しての相対品種間差では、例えば、耐性品種 Steptoe, KoA はアルミニウムストレスには最も感受性であった。すなわち、酸性ストレスの応答とアルミニウムストレスの応答に相関がなかった。このことから、種子根の伸長能には、異なる酸性ストレス応答性遺伝子とアルミニウムストレス応答遺伝子があると推定した。

既報¹⁰⁾ではアルミニウムストレスにより Kearney の根の本数はストレスないもの (9.3 本) に比べ増加し (15.3 本)、その増加率 (1.64 倍) は Dayton が 7.2 本から 7.9 本に 1.1 倍増加することより大きいと報告されている。この報告にある 15.3 本の根は種子根と冠根が識別されておらず、本研究では種子根の最大本数な 9 本であることから、約 6 本は冠根であると推察される。すなわち、既報ではアルミニウムストレスにより冠根出根の促進が推定された。本研究では、使用した 10 品種全てで、酸性ストレス、アルミニウムストレスによる冠根出根促進が観察された (Fig. 5)。10 品種を比較してみると、酸性ストレスによって Mokusekko3 の冠根出根は約 5 倍に促進されるが、Morex では約 1.3 倍に過ぎず品種間差は大きい。一方アルミニウムストレスにより Mokusekko3 の冠根出根は約 2 倍に、Morex では 3.8 倍に促進されている。以上のように、10 品種の相対的応答性を比較すると、酸性ストレス応答とアルミニウムストレス応答は異なることから、それぞれことなる遺伝子により制御されていると推定した。

Fig. 6 では、酸性ストレスとアルミニウムストレスは全ての品種の冠根の伸長能を阻害したことを示した。その阻害度の品種間差は大きく、Morex は酸性ストレスに耐性であるがアルミニウムストレスに感受性であり、Mokusekko3 は酸性ストレスに感受性であるがアルミニウムストレスに耐性であった。以上から冠根の伸長能に対する酸性ストレス応答遺伝子とアルミニウムストレス応答遺伝子は異なると推定した。総合して、

1. 種子根の出根能に対する酸性ストレス応答遺伝子
2. 種子根の出根能に対するアルミニウムストレス応答遺伝子
3. 種子根の伸長能に対する酸性ストレス応答 (耐性) 遺伝子
4. 種子根の伸長能に対するアルミニウムストレス応答 (耐性) 遺伝子
5. 冠根の出根能に対する酸性ストレス応答 (促進) 遺伝子
6. 冠根の出根能に対するアルミニウムストレス応答 (促進) 遺伝子
7. 冠根の伸長能に対する酸性ストレス応答 (耐性) 遺伝子
8. 冠根の伸長能に対するアルミニウムストレス応答 (耐性) 遺伝子

以上 8 種の遺伝子を推定し、中でも品種間差の大きな 4 種の冠根の応答遺伝子の遺伝子連鎖分析が可能であると考えられた。

3] 種子根後期生育と冠根後期生育期 (ステージ D の 10 日間)

すでに種子根はその出根を完了し、伸長が継続し、冠根では出根は開始し、それに伴い伸長している期間である。Dayton と Kearney の種子根伸長能はアルミニウムストレスにより阻害され、その 2 品種間の差は小さかった。すなわち、2] において前述したように、ステー

ジCまで Dayton 種子根の伸長能は Kearney に比べよりアルミニウムストレスに耐性を示したが、このステージDではその応答（耐性）遺伝子は機能していないと考えられた。また、冠根の出根能は Kearney でアルミニウムストレスにより阻害され、ステージCで機能した冠根出根能促進遺伝子は機能せず、Dayton ではステージCで機能した遺伝子はステージDでも冠根出根能を促進したと推定した。Dayton の冠根伸長能に対するアルミニウム耐性遺伝子はステージDにおいても機能していると考えられた。

1 1 . 今後の展開

前述したように、本研究 IV の水耕栽培実験結果は前研究 III の土壌栽培実験系の結果と対比することが重要である。しかし、土壌栽培実験における酸性土壌ではアルミニウムストレスとそれが原因となるリン酸欠乏、カルシウム欠乏ストレスは避けられない。今後水耕栽培実験においてリン酸欠乏、カルシウム欠乏ストレスが及ぼす種子根と冠根の出根能、伸長能への影響を検討したのち、前研究 III の土壌栽培実験系の結果と対比することとする。

1 2 . 参考文献

1. Burgess, P.S. and F. R. Pember. Rhode Island Agri. Exp. Sta. Bull. 194, 1923
2. MacLean F.T., and B.D. Gilbert. Soil Sci. 24, 163-175, 1927
3. Polle E. et al., Crop Sci. 18, 823-827, 1978
4. Foy C. D. et al., Agronomy J. 57, 413-417 1965
5. Minella E. and M.E. Sorrels. Crop Sci., 32, 593-598, 1992
6. Kleinhofs A. et al., Theor. Appl. Genet. 86, 705-712, 1993
7. Saeki E. et al., Theor. Appl Genet. in press, 1999
8. Viets F.C. Plant Physiol. 19, 466, 1944
9. Hecht-Buchholz C. and J. Schuster. Plant and Soil 99, 47-61, 1987
- 10 Reid D.A. Et al., Agronomy J. 63, 600-603, 1971

1 3 . 研究業績

1 3 1 . 原著論文

1.

1 3 2 . 総説 なし

1 3 3 . 国際学会発表

1. A. Saito, Y. Masaoka and K. Sato (1998) Developmental Tolerance of acid/aluminium for Barley. 1998 National soil acidification conference 15-17 July in Australia
2. A. Saito, Y. Masaoka and K. Sato (1999) Differential responses of seminal and crown roots among barley cultivars (*Hordeum vulgare*) under acid and acid/aluminium stress in hydroponics. Plant and Animal Genome VII Jan. 17-21 in Sandiego, CA

1 3 4 . 国内学会発表

1. 齋藤彰，正岡淑邦，小林紘一，永井尚生，荒川祐介，宮崎力，
羽鳥聡：植物細胞におけるアルミニウムの作用・機能解明。
第7回東京大学原子力研究総合センターシンポジウム

- 1 3 5. 新聞 なし
- 1 3 6. 特許 なし

1 4 . 英訳

- (1) Research title : Tolerance Mechanisms for Aluminium stress in plant
Research sub-title : Barley root responses to Aluminium stress in hydroponics
- (2) Research organization : Labo. of Plant Biotech, Kyushu National
Agricultural Experiment Station (KNAES)
- (3) Researcher : Akira Saito
- (4) Co-researchers : Y. Masaoka (KNAES)
K. Sato (Okayama Univ)
- (5) Research periods : 1995-1999
- (6) Abstract

It is well known that growth of the leaves and stem, and the roots in most plants were damaged in acid soils. Because that abundant aluminium in the soil is ionized at the acidity in the soil, the ionized aluminium seemed to inhibited the growth of plant roots. Since hydroponic system under acid condition was established, such acid soil effects on the plant growth were mainly explained by some reasons of aluminium toxicity for the root elongation, no effect of acidity on the root growth, and secondary results in the inhibition of the leafy growth. In this study, a conventional selective method for aluminium tolerance of wheat seminal roots, hamatoxylin staining would not be applicable for selection of the barley aluminium tolerance. To reexamine the previous explanation for acid soil tolerance in barley, we observed developmental morphology of the seminal and crown roots in ten cultivars including aluminium (Al) tolerant cv. Dayton, sensitive cv. Kearney, acid tolerant Brindabella, and the other seven cultivars used for molecular map construction in barley (*Hordeum vulgare*) under the condition of acid (pH 4.0), and different Al concentrations in hydroponics. At a stage of seminal roots (early stage of crown roots), the total length of these seminal roots under acid stress and acid/Al stress was decreased to be 20-30% and 13-20% of no acid stress (pH 5.8) and no Al stress (0 mM) respectively, while the total number was almost not affected. On the other hand, total number of crown roots was increased not only by acid stress but also by acid/Al stress, although the total length was inhibited in both conditions. This indicated that the seminal roots and crown roots might responded differentially to acid and acid/Al stress. No significant correlation was found between tolerance to acid stress and to acid/Al stress in seminal roots as well as crown roots among ten cultivars tested. All the results

suggested that multiple, maybe four genetic factors might control acid tolerance and Al tolerance in root emergence and elongation of barley seminal roots and other four genetic factors might control the induction of crown root emergence and elongation differentially by acid and acid/Al stress.