

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の基本実験系マニュアル

(1999年4月 今泉(安楽)温子)

1992年、デンマークのStougaardらにより、マメ科のモデル植物候補としてミヤコグサ *Lotus japonicus* の名が広く世界に伝えられました。以来、現在まで日本でのミヤコグサ研究の中心となってきた、東京大学川口研(旧庄野研)及び農業生物資源研究所窒素固定研(河内研)で蓄積されてきたミヤコグサの基本的な実験手法を、今回このような形でマニュアルとしてまとめました。これから新たにミヤコグサを用いて研究を始める方々の参考となれば幸いです。実験を行うにあたり、疑問点・質問などがありましたら、今泉(安楽)まで連絡をいただければ対応いたします。また、新しい有効な実験系・手法が確立できましたらご連絡いただき、この実験系マニュアルをさらに発展させて行きたいと考えておりますので、ご協力をお願いいたします。

今泉(安楽)温子 IMAIZUMI-ANRAKU HARUKO
 〒305 つくば市観音台 2-1-2 農業生物資源研生理機能部耐病性研究室
 Tel 0298(38)8377
 e-mail address onko@ss.abr.affrc.go.jp

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の基本実験系マニュアル目次

1. 種子収穫を目的とした屋外型環境調節装置内での植物栽培 (種子播種から種子収穫まで)
2. 人工交配法
3. *in vitro* 感染実験法 (ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* を用いた)
 - (3-1) 種子滅菌・播種
 - (3-2) スラント状寒天培地上での感染実験
 - (3-2a) ガラスチューブを用いた感染実験
 - (3-2b) プラスチックプレートを用いた感染実験... Spot inoculation
 - (3-3) inoculation pouch を用いた感染実験
 - (3-4) スライドグラスを用いた感染実験... root hair curing 観察実験系
4. 使用培地組成
5. 参考データ

1. 種子収穫を目的とした屋外型環境調節装置内での植物栽培 (種子播種から種子収穫まで)

基本的に使用する土壌は、下記の二種類である。

新パワーソイル(関東肥料工業(呉羽化学工業))・植物の生育に必要な栄養分を十分に含んでいる粒状土壌

パーミキュライト(ニッタイ株式会社)*1・栄養分を殆ど含んでいない土壌、水はけが良い

(1) 種子準備; 播種する種子*2を小型乳鉢に分け取り、2cm×2cmにカットしたサンソーパー*3を、乳鉢壁面にこすりつける要領で、種子表面をこする。種皮の艶が薄れるくらいまでこすったら、1.5ml エッペンドルフチューブにいれ、蒸留水を加えてしばらく置き、吸水させる*4。

(2) 土壌準備; 使用する容器(プラスチック製のポット、バットなど)の底に、厚さ1-2cm程にパーミキュライトを敷き詰め、その上からパワーソイルを容器の8分目位まで入れる。土壌に十分に吸水させる。

(3) 種子播種; 土壌表面に1cm深ほどの穴をあけ、吸水して膨張した種子を播種し、土をかぶせる。土壌表面の加湿を防ぐため、パーミキュライトを1-2cm深ほどかぶせる。水をまき、土壌と種子をなじませる。

(4) 栽培条件; 16h Light/8h Dark、気温 25℃ で栽培するのが望ましい*5。この条件下において、種子播種後、約 1.5 カ月後より開花し始め、約 2.5 カ月後より種子収穫が可能である。

(5) 水やり; ミヤコグサは過度の水分を好まない(過度の水やりにより、土壌表面に藻類がわき、特に種子~幼苗の生育が著しく阻害されるため、水やりは慎重に行う必要がある)。また、補光灯下や、4月~9月の天然光の強い時期には、高温・乾燥のため播種した種子の多くが、生長できない場合がある。大切な種子を失敗無く栽培するためには、(3-1)で触れる播種方法で、seedlingをある程度まで育ててから、温室土壌に移植するのがより確実である。

(6) 種子収穫; ミヤコグサでは、種子の登熟とともに莢が裂開し、種子が飛び散るため、種子の成熟具合を見極めて莢が裂開する前に収穫するのが望ましい。種子の成熟の基準は、下記の3点である。

- 1) 莢全体が茶褐色に変色する
- 2) がくが完全に乾燥してひからびた状態になる
- 3) 莢の表面ががさがさした感じになる

上記の条件を満たした莢を収穫し、紙封筒にいれ、温室内で一週間以上置き、十分に乾燥させる。乾燥すると自然に莢が裂開するので、種子を採取する。種子をもらさず回収したい場合は、裂開した莢を、乳鉢・乳棒でこすりつぶし、莢内に残留している種子と併せて回収するとよい。

(7) 種子保管; 採取した種子は、蓋に針などで穴をあけたチューブ(エッペンドルフチューブ、FALCONE チューブ)に入れ、室温で保管する。

【注意事項】

*1; これまで使用したパーミキュライトの中では細粒であり、ミヤコグサの生育に適している。

*2; ミヤコグサ(B-129 Gifu)種子数の目安は、0.12g = approx. 100seeds である。種子は、茶色くて、丸みを帯び、艶のあるものを用いると良い。

*3; サンドペーパーで、現在窒素固定研で用いているのは、「耐水研磨紙#500/材質天然石」、東京大学川口研で用いているのは、「KIMIGAYO・sandpaper K 金剛 120」である。ともに、種子を傷つけ過ぎず、均等に擦ることができる。

*4; 種皮のこすり具合は、その後の種子の吸水の善し悪しを決める重要な要因である。(吸水しない種

子は、発芽しにくく、同調的に生育した seedling を用いる実験において不適である・・・詳細は、(3-1)の項で)

*5; ミヤコグサ(B-129 Gifu)は、蛍光灯下では花芽をつけにくいので、天然光下(温室)で、水銀灯などで補光し、16h Light/8h Dark の光環境をつくるのが望ましい。

2. 人工交配法

ミヤコグサは自家受粉性なので、開花時にはすでに受精している。そのため、開花前の蕾を開き、雄ずいを除去する必要がある。ミヤコグサは蝶形花であり、正面から見ると、上後方に1枚の旗弁(standard petal)、左右に1対の翼弁(wing petals)、下前方に雄ずい・雌ずいを包む2枚の竜骨弁(keel petals)がある(Figure 2-1)。自家受粉前の蕾は小さく、雄ずい・雌ずい共に竜骨弁に覆われているため、これらを傷つけることなく除去し、受粉する作業にはある程度の習熟を要する。交配成功率を高めるため、交配作業は2日に分けて行う。

《1日目》未成熟な雄ずいの除去

《2日目》花粉収集及び成熟した雌ずいへの受粉

人工交配に必要な用具・材料

ピンセット（先端の鋭利なもの[INOX No.5, Fontax 社]など。雄ずい除去用及び花粉収集用に各1本ずつ準備するのが望ましい）

頭にかぶる（めがねにかける）タイプの拡大鏡（慣れれば必要ない）

綿棒（ベビー用の先端の細いもの、一本ずつ小分けにされているものなどが良い）

TCPPN(2, 4, 5- trichlorophenoxypropionic acid, 落花防止剤)

70%(v/v) エタノール（花粉不活化用）

スプレー容器（落花防止剤・花粉不活化アルコール用、各1個）

FALCONE2059(14ml)チューブ（交配花保護器用）

竹串（交配花保護器用、15-20cmのものが良い）

エッペンドルフチューブ（花粉収集用）

ビニールテープ（黄色・緑色以外のカラフルなものが良い）*1

油性ペン（掛け合わせの記録用）*2

交配花保護器の作り方

竹串に FALCONE2059 チューブをビニールテープで留めつける(Figure 2-3)。竹串を土に差し込み、交配した花をチューブで覆い、外部からの物理的衝撃、乾燥を防ぐことで、落花を防止する効果がある。

《1日目の作業；交配用蕾の選抜、雄ずいの除去、交配花保護器設置》

(1-1) 交配用蕾の選抜(Figure 2-2)参照

(Figure 2-2A)に、ミヤコグサ蕾の発達段階を示した。これらのうち、stage4の蕾(Figure 2-2B)では葯から花粉は放出されていないが、雌ずいはまだ未発達であり（雌ずい先端が屈曲しているのが特徴）、掛け合わせに用いても成功率が低く、得られるF1種子数も少ない。また、stage5では雌ずいは十分発達しているが（雌ずい先端が伸長しているのが特徴）、すでに成熟花粉が放出されているため、自家受粉の危険性が高くなる（矢印）。そこで、掛け合わせには stage4の蕾を用い、雄ずい除去後一日をおいて、翌日成熟した雌ずいに受粉する。

(1-2) 竜骨弁の除去

雌親の蕾を左手親指と人差し指で優しくつまみ、竜骨弁と翼弁間にピンセットをそっと差し込む。ピンセット先端で後方に押し広げられた翼弁を、親指と人差し指でつまみ押さえる。露出した竜骨弁の下部（とがった先端部分から数ミリ下の張りのある部分）をピンセットでそっとつまむ*3。そのまま、斜め上方に引き抜く感覚で、竜骨弁を除去する*4。

(1-3) 雄ずいの除去

露出した雄ずい（袋状の葯が10個確認できる(Figure 2-3A)）の葯の付け根をピンセットでつまみ、葯をすべてつまみとる(Figure 2-3B)*5。残っている翼弁と旗弁で雌ずいをそっと覆う。5mm幅に切ったビニールテープに油性ペンで日付等を記入し、茎を挟むように張り付ける。落花防止剤（10mg/L TCPPN）をスプレーし、交配花保護器で覆う*6。

《2日目の作業；花粉収集、交配》

(2-1) 花粉の収集

開花している雄親の花の竜骨弁先端を指でそっとつまみ、そのまま引き抜く*7。約10-20個の竜骨弁部分を集める。竜骨弁の付け根部分の一端を左手で軽くつまみ、エッペンドルフチューブ外壁面に沿わせるようにしておさえ、ピンセットで付け根部分の另一端を右側に引っ張ると、竜骨弁先端にカートリッジ状にたまった花粉が、チューブ内に落下するので、これを集める(Figure 2-4)。

(2-2) 交配

前日雄ずいを除去した雌親の蕾では、除去時に比べ、雌ずいが発達・成熟して、まっすぐ伸長した状態になっている(Figure 2-3C)*8。花粉を綿棒にとり、雌ずい先端の柱頭にそっとまぶしつけ受粉する*9。受粉終了後、残っている翼弁で雌ずい部分をそっと覆う。ビニールテープに雄親・掛け合わせ日付等を記入して茎に張り付け、落花防止剤をスプレーし、交配花保護器で覆う。

【注意事項】

- *1; ミヤコグサの花・葉・茎の色は避ける。原色・パステルカラー・白・グレーなどが目立って良い。テープは、はがれ落ちぬよう、しっかりと張り付けること。
- *2; 交配終了後、F1種子収穫まで、約1ヶ月かかるので、その間、色の薄れない油性ペンを使用する。
- *3; 竜骨弁下部には、雌ずいが通っているので、ピンセットで傷つけないよう丁寧に扱う必要がある。蕾を扱う際、もっとも注意を要する作業である。
- *4; ピンセットでのつまみどころが悪いと、竜骨弁が裂けてしまうことがある。雌ずいに損傷がなければ、丁寧に花弁を取り除き、以後の交配に使用できる。
- *5; 花粉が放出されているか必ず確認すること。花粉が放出されていない葯は、ぼろぼろと取れやすい。ピンセット先端で軽くつまむだけで除去できる。
- *6; 落花防止剤はあまりスプレーしすぎないように気をつける（蕾がしめりすぎると、逆に落花の原因となることもある）。交配花保護器は、蕾をチューブ内に納めてから土に指すと安定して良い。雄ずい除去後、長時間放置しすぎると、雌ずいへのダメージが大きくなる。前日の午後から夕方にかけて除去作業を行い、翌日の午前中から昼頃にかけて交配するのがベストである。
- *7; カートリッジ状の花粉より下部をつまむと、竜骨弁先端から花粉が漏れ出てくるので注意する。
- *8; この段階で、雌ずいがstage4の段階にあるものは、雄ずい除去の際にダメージを受けたものであり、落花する可能性が高いので使用しない。雌ずいがstage5の段階まで成熟しているものを交配に用いる。
- *9; 花粉の量が少ないときなどは、濾紙を1.5cm幅に切り、先端が鋭利になるように細断したものを用品でも良い。

【参考データ】(Figure 2-5)

(1)雄ずい除去後すぐに交配

(2)雄ずい除去後、保護器で覆い一日おいた後、交配

(3)雄ずい除去後、そのまま一日おいた後、交配

上記の3実験区において、1ヶ月後の掛け合わせ成功率及びF1種子数を示した。

雄ずい除去後一日おくことにより、雌ずいが成熟した分、F1種子数が増加している。また、交配花保護器で覆うことにより、交配成功率が上昇する。

3. *in vitro* 感染実験法

ここでは、まず、種子滅菌及び無菌条件下での種子の播種、seedling の準備について記述する。これは、ミヤコグサ栽培(1)にも応用可能であり、種子の無駄な損失を最低限に抑え、seedling を同調的に生育させるのに有効な方法である。

(3-1)種子滅菌・播種

(1) 種子準備；播種する種子を小型乳鉢に分け取り、2cm×2cm にカットしたサンドペーパーを、乳鉢壁面にこすりつける要領で種子表面をこする(1-1と同様に)。すべての種子のこすれ具合を均等にするため、一回あたりの乳鉢でこする種子数(1セット)は20-30個とする*1。サンドペーパーは1セットの種子を擦るごとに、新しいものに替えること。

(2) 滅菌溶液準備；滅菌用溶液(2% hypochlorite, 0.02% tween20)*2を準備する。一度に滅菌する種子数が100個前後の場合は、FALCONE 2059 チューブに3-4ml、200個を超える場合は、FALCONE 2070 チューブに10-15mlの滅菌溶液を目安とする*3。

(3) 種子滅菌開始；種子を滅菌溶液に入れ、vortexで数回(1回5秒前後)しっかりと混和する*4。その後shakerにのせ、ゆっくりと揺する。滅菌の基準時間は、種子を滅菌溶液に入れてから10分間である*5。

(4) 種子洗浄；滅菌が終了したら、速やかに滅菌溶液をチューブから捨て、滅菌蒸留水を加え、vortexにて1回5秒間前後、数回混和・洗浄する*6。すぐに洗浄液を捨てて、新しい蒸留水を加え、shakerで15-20分間、ゆっくりと揺する。

(5) 種子洗浄・吸水；15-20分間ごとに、新しい蒸留水に交換し、計2時間以上の洗浄・吸水を行う*7。この時点で、十分に吸水した種子は種皮色が薄くなり、サイズも二回りほど大きくなる*8。

(6) 播種；0.7%(w/v)寒天を含む水寒天プレート上に、ピンセットを用い、一粒ずつ播種する*9。seedlingを使用する実験内容により、播種後の栽培方法が異なる。

(a)寒天培地上での感染実験に用いるseedlingの準備

寒天培地(スラント)上での感染実験では、同調的な感染過程を追跡するため、まっすぐに根が伸びたseedlingが必要である。9cmシャーレあたり、50-60個の種子を等間隔に播種後、パラフィルムでシールして、シャーレを垂直に立て、25-26℃で2-3日静置する*10。根がすんなりと伸びたseedlingのみ*11を選抜し、以後の実験に用いる。

(b)パーミキュライト(inoculation pouch)での感染実験に用いるseedlingの準備

パーミキュライトでの感染実験においては、根がしっかりと張ったseedlingが必要である。9cmシャーレあたり、50-70個の種子を等間隔に播種し、ビニールテープでシールして、25-26℃、16h Light/ 8h Darkに4-5日間水平に静置する*12。根が発達し、子葉が展開したseedlingのみ*13を選抜し、以後の実験に用いる。

【注意事項】

*1; 1セットあたりの種子数が20-30個を超えると、種子全体を均等に擦ることができなくなり、発芽率の低下につながる。また、擦り具合が足りないと種子が吸水せず、発芽の遅れ・未発芽の原因となる。乳鉢にサンドペーパーを何度もこすりつけ、種子が壊れるのでは・・・と危惧するほどまで擦ってちょうど良いぐらいである。しかし、擦りすぎると、滅菌溶液の種子への急激な浸透が起こり、発芽しないので注意する。幾度か滅菌実験を行い、「自分の擦り具合の目安」を見極めていくと良い。

*2; 次亜塩素酸ナトリウム溶液(KANTO Chemical Co., INC.; 5.0% of active chlorine)を使用している。形質転換やスラント状寒天培地上での感染実験など、完全な無菌条件下での実験に用いる種子を滅菌する場合は、2-3倍希釈液を、ノザン用サンプリングや温室での栽培に用いる種子の場合は3-4倍希釈液

を用いている。栄養リッチな培地上で、長期間の培養に用いる種子は、種子を擦った後、90%エタノールに短時間（30-60秒）さらした後、滅菌溶液に入れると良い（エタノール処理することにより、種子表面が滅菌溶液になじみやすくなる）。一方、数の少ない種子や滅菌に弱い種子（変異体など）を、滅菌する場合（土壌播種を目的とするもの）は、次亜塩素酸濃度をさらに下げて、マイルドな条件で滅菌するとよい。

- *3; FALCONE2070 チューブで、一度に滅菌できる種子数の目安は、1000 個前後である。
- *4; vortex することで、種皮表面に生じる気泡を除去し、滅菌溶液と種子表面を効果的に接触させることができる。また、vortex 後、チューブ壁面に種子が付着したまま残らないように気をつける。
- *5; 滅菌の基準時間は 10 分間であるが、滅菌に弱い種子（変異体など）、滅菌途中で種皮の擦りすぎにより急激な吸水が起こった種子が認められたときは、滅菌時間を短縮する場合もある。上記の注意事項*2 とあわせ、種子の状態を見ながら滅菌溶液濃度・滅菌時間を変動させると良い。
- *6; 滅菌終了後、チューブ壁面・種子表面に残留している次亜塩素酸を洗い流し、次亜塩素酸の種子へのさらなる浸透を抑える必要がある。次亜塩素酸滅菌溶液を捨てた直後の蒸留水での洗浄作業は速やかに行う。
- *7; 滅菌後の種子洗浄・吸水時間は、2 時間～O/N でよい。
- *8; 蒸留水による洗浄開始から 20-30 分で、吸水による種子の膨潤が認められる。
発芽しない種子；種皮がはがれ落ちたもの・種皮が不自然に開裂し種子内部が露出したもの（種皮の擦りすぎにより、種子内部まで次亜塩素酸が急速に浸透してしまったもの）。これらは、滅菌・洗浄途中で、種子内部が部分的に露出し、蒸留水表面に浮き上がってくるので、除去する。
同調的に発芽する種子；種子のごく一部が開裂している or していないが、種子全体がふっくらと膨張しているもの。
吸水しない種子；2 時間を越えても吸水しない種子は、擦りが足りなかったものであり、同調的な発芽は望めない。吸水しない種子のうち、表面がつつやで水分をはじくもの(c-1)は、以後何時間水に浸漬しても吸水しない。種子サイズは小さいが、水分をはじかない種子(c-2)は、遅れながら吸水し発芽できる種子である。これらの種子のうち(b)及び(c-2)は、寒天プレート上に播種した後、ホイルでくるんで、低温処理(4℃、1 週間程度)すると、ある程度同調的に発芽させることができる。
- *9; 0.7%の寒天は、根が寒天内に侵入しても根の伸長を阻害しない濃度である。根の伸長に適した寒天は、寒天末(IWAKI KAGAKU Co., LTD)、Bacto Agar (Difco)である。
- *10; 3 日以上放置すると、気中根（寒天表面にはわずに根が空気中に伸長したもの）の割合が増える。移植後スラント寒天培地上で、根を順調に伸長させるためにも 2-3 日の静置が望ましい。
- *11; 発芽種子の中には、種皮に根が引っかかり、根の伸長を阻害するものがある。これらについては、先端の鋭利なピンセットで種皮をそっと摘み取り、根の先端がつぶれていないものについては実験に用いることができる。
- *12; 静置期間が 1 週間をこえると、寒天培地内に根が張りすぎて、無菌条件下での移植に不適となる。
- *13; 発芽後、根は伸長しても子葉が展開しないもの、子葉部分が種皮から脱出できず胚軸が切れてしまうもの等が若干存在するので除外する。また、子葉が展開しても、葉身全体が透明なものは、以後生長しないので、実験に用いない。

(3-2) スラント状寒天培地を用いた感染実験

スラント状寒天培地上に根を伸長させ、根粒菌の感染過程を経時的に追跡することを目的とした *in vitro* 感染実験系である。この感染方法では、最短で接種後 7 日目*0 より根粒の着生が認められた。

(3-2a) ガラスチューブを用いた感染実験

(1) 培地準備；ガラスチューブは 150mm × 24mm のものを用いる。1 チューブあたり、0.9%(w/v) 寒天を含む nitrogen-free 培地*1 を 20ml 入れ、スラント状寒天培地をつくる。

(2) 接種菌準備；菌は YEM or TY 培地で培養する*2。28℃ で培養開始後 2-3 日の菌培養液をエッペンチューブにとり、12,000 rpm, 2min, 4℃ で遠心・集菌する。滅菌蒸留水に懸濁後、遠心集菌して同様に 2 回洗う。OD₆₁₀ をチェックし、 $1 \times 10^{6-7}$ bacteria/200μl 菌懸濁液となるように希釈する*3。ミヤコグサ菌 (*Mesorhizobium loti* JRL501) の菌濃度は $OD_{610}=1.0$ 1×10^{10} bacteria が基準である。

(3) 接種；スラント状寒天培地は作成後しばらくおくと、培地中の水分がガラスチューブの底の部分に約 2ml しみだしてくる*4。この水に、菌懸濁液 200μl を加え、チューブを軽く揺すって混和し、さらにチューブを傾けて、スラント状寒天培地表面全体になじませる。次に、(3-1-6a)で準備した根がまっすぐ伸長した seedling (最大 1 tube あたり 5 本まで) を、スラント状寒天培地上に置き、再びチューブを傾けて、菌懸濁液と seedling を接触させる*5。接種終了後、チューブの seedling の胚軸から下の部分をアルミホイル等でくるんで遮光し、16h Light/ 8h Dark, 25-26℃ の growth chamber 内に静置する。

【注意事項】

*0; これまでの実験から、ミヤコグサ(Gifu, B-129) と *M. loti* JRL501 の組み合わせの感染では、接種後 7 日目より、肉眼で根粒(根粒原基)の着生が認められた。しかしながら、使用する growth chamber 内の環境、seedling/bacteria のコンディションなどの複数の要因により、根粒着生までの時間は変動しやすい。(3-1-6a)で準備した seedling のうち、根の伸長が良いもののみを選び、bacteria も log phase にあるものを使用すると良い。これまでの根粒着生までの平均期間は 10 日間で、以後同調的な根粒形成・根粒成熟が認められた。

*1; Nitrogen-free 培地として B&D 及び Niftal 培地などを使用している。(培地組成は、4 に記載)

*2; 主に YEM を使用している。(*M. loti* JRL501 は、寒天培地で培養する場合、TY 上ではコロニーが形成されにくいいため、YEM 寒天培地のみを使用している。培地組成は、4 に記載)

*3; 接種菌濃度は、 $1 \times 10^{6-7}$ bacteria/ tube で十分である。培養培地中の窒素源(yeast extract など)は根粒形成を阻害するので、遠心・集菌による洗浄をしっかりと行うこと。

*4; 培地を低温下で保管しておくこと、チューブ底に水分がたまっていくので、寒天培地全面に菌懸濁液を均等に行き渡らせるために、これを利用する。

*5; *4 で、寒天表面をしめらせ、*5 において、seedling 根と接種溶液を接触させることで、根先端が寒天培地表面となじむ。寒天表面を根がスムーズに這い、伸長するのを促す効果がある。

(3-2b) プラスチックプレートを用いた感染実験・・・ Spot inoculation

根粒形成初期過程を経時的にサンプリングする際に有効な実験系である。窒素固定研において、低融点アガロースを用いた spot inoculation 実験系を確立した*0 ので、これについて記載する。

(1) 培地準備；滅菌二号角シャーレ(EIKEN KIZAI Co., LTD)1 枚あたり、35ml の 0.9%(w/v) agar in nitrogen-free 培地を入れ、培地プレートを作成する*1。

(2) Seedling 移植；(3-1-6a)で準備した seedling を 1 プレートあたり(プレート長辺を水平にした状態で)、10-15seedlings 移植する。プレート上部の一部分、5cm 程度をサージカルテープ(Micropore™, 3M)で

とめ*2、残りの部分はビニールテープでシールした後、seedlings の根の部分にあたる領域をホイルでくるんで遮光し、プレートを垂直に立てた状態で、growth chamber で 5-7 日間静置する。

(3) 接種菌準備；菌は YEM or TY 培地で培養する。28℃ で培養開始後 2-3 日目の菌培養液 1ml をエッペンチューブにとり、12,000 rpm, 2min, 4℃ で遠心・集菌する。滅菌蒸留水に懸濁後、遠心集菌して同様に 2 回洗う。洗浄後、菌を 200 μ l の滅菌蒸留水に懸濁する*3。これに、50 μ l 黒インク(Pilot Black ink) を加え、ピペティングにより混和する。

(4) 接種源(inoculation mixture)準備；低融点アガロース (Sea Plaque^(R) GTG^(R) Agarose, FMC Bio Products)、を使用する。1%(w/v)低融点アガロース溶液をあらかじめつくっておき、電子レンジで溶かし、人肌まで冷ます。アガロース溶液 50 μ l をエッペンドルフチューブにとり、ここに 25 μ l の接種菌溶液 (含黒インク) を加え、ピペティングにより混和する*4。

(5) 接種；(2)で準備したプレートを、垂直に立てたまま、シールしていたビニールテープをはずす。プレートを開き、底にたまった水分を根に接触させないように捨てる*5。プレートを水平に置く。ピペットマンに white tip (0.5-10 μ l 用) を装着し、(4)で準備した接種源を 10 μ l 程度とる。伸長した根の EH zone (emerging root hair zone; ちょうど root hair が発達・伸長し始めた領域*6。根粒菌感染に対する感受性が最も高い領域である) に、接種源をボール状になるよう、丁寧にスポットする*7。接種終了後、プレートをビニールテープでシールし*8、根の部分のホイルでくるみ、垂直に立てた状態で、16h Light/8h Dark, 25-26℃ の growth chamber に静置する。

【注意事項】

- *0; 低融点アガロースを用いた接種実験系の検討・確立は丹羽忍 (東京理科大)、今泉 (安楽) 温子 (東京大学)、河内宏 (農業生物資源研) による (投稿中、1999 年 4 月時点)。この方法により、接種後 4 日目に実体顕微鏡下で根粒原基の形成が、7 日目には根粒の着生が認められる。(この方法は、Nod factor のスポット処理にも応用可能である。(丹羽、修士論文より))
- *1; 根を寒天に這わせて伸長させるため、寒天は傾かず、水平な状態で固化したものを使用する。(傾いているものを使用すると、寒天内に根が伸長したものや、気中根の出現頻度が増える)
- *2; 静置時間経過と共にプレート下部に水分がたまってくるため、プレートの通気を良くすることを目的としている。
- *3; Spot inoculation 感染系において、根粒形成に有効な菌濃度は決定していない。大まかな指標としては、OD₆₁₀=0.7-1.0 前後の菌培養液 1-2ml を洗浄後、200 μ l に濃縮して用いている。
- *4; 上記の低融点アガロースは、Melt Temp.=65℃, Gel Temp.=26-30℃ である。接種菌と混和後も、ときどきピペティングにより混和していれば、しばらくは固化しない。
- *5; しっかりとしたボール状のスポット (窒素固定研では、「炭団 (たどん)」と呼んでいる) を作るために、根の先端は決して水でしめらせてはいけない (水と接触すると、接種源が根表層にとどまらずに流れやすくなるためである)。根を伸長させる過程においても、根に水分を接触させると根毛の発達が抑制され、Spot inoculation に不適となるため、注意する。
- *6; EH zone は、複数のマメ科植物において、根粒菌感染に最も感受性の高い領域として報告されている。(これまでの実験において、ミヤコグサにおいても同様の結果が得られている)。根毛が EH zone まで長くびっしりと生えている根では、接種源が流れにくく、「炭団」をつくりやすい。このような根を得るためには、(a)低温条件下(20℃以下)に seedling をおかない。(b)プレートの底にたまる水分と根端を接触させない。の 2 点が重要である。
- *7; スポットのこつとして、
 - @tip 先端に接種源を少し押し出す。
 - @EH zone に tip を近づけ、押し出した接種源と EH zone の根毛を軽く接触させ、接種原の「足場」をつくる。

④接種源をさらに押し出し、「足場」に接触させる。

これを何度か繰り返すうちに、「足場」が大きくなり、炭団をつくることができる。1個の炭団は接種源 3 μ l 程度である。

*8; 長期間プレート静置すると、寒天全体から水分が飛んでしまうため、接種終了後は、プレート全体をビニールテープでシールすると良い。

(3-3) Inoculation pouch (Leonard jar)を用いた感染実験

多数の植物体への感染実験及び、根粒の大量サンプリングに適した方法である。(2-2)のスラント状寒天培地を用いた感染実験に比べ、植物体1個体あたりの根粒着生数も多い。ただし、地下部がパーミキュライト内で生育・発達するため、1個体での経時的な根粒形成過程の観察には不適である。

inoculation pouch の材料; autoclavable かつ、ミヤコグサの栽培に適した inoculation pouch の材料となるプラスチックケースは、下記の二つである。

プラントボックス(CUL-JAR300; IWAKI Lab. Ware)

ラストロウェア・KEEPER series (100mm × 115mm; IWASAKI Industry INC.)*1

また、inoculation pouch 下段(水供給部)から上段(植物生育部)をつなぐロープは、綿100%または、綿/レーヨン(50/50)の編み目が密なロープが適している*2。

(1) inoculation pouch の準備; inoculation pouch 1個あたり、プラスチックケース(同型のもの2個)、ロープ(約17-18cm)が必要である。準備手順は下記の通りである。

(a) 1個のプラスチックケース(inoculation pouch 上段にあたる)の底中央に、ドリルで直径8mm程度の穴をあける。ロープの一端をかた結びし、プラスチックケース内部に結び目残り、ロープ部分(10cm弱)が穴より外に露出するように通す。穴を開けていないプラスチックケース(inoculation pouch 下段にあたる)の3-4分目まで、水道水をいれ、上から、ロープを通したプラスチックケースをしっかりとめ込む。

(b) プラスチックケース上段に6-7分目までパーミキュライトを入れる。パーミキュライトが程良く湿るまで、上から水道水をまわし掛け、蓋をする*3。これまでの工程により、ロープを経由して、下段(水供給部)と上段(パーミキュライト部)間の水分の行き来ができる構造になる。できあがった inoculation pouch を autoclave する。

(2) Seedling 移植; (3-1-6b)で準備した、根がしっかり生えている seedling を、1pouch あたり ~16seedlings (プラントボックス) / ~40seedlings (ラストロウェア) 移植する*4。

(3) 接種菌準備; 150ml YEM 培地(500ml コルベン)で接種菌を3-4日間振とう培養する(28℃, 160rpm)。菌培養液を氷中で冷却後、300ml 遠心チューブにとり、7,000rpm, 10min, 4℃で遠心・集菌する。滅菌蒸留水に懸濁後、遠心集菌して同様に2回洗う。洗浄後、菌を500mlの nitrogen-free 液体培地に懸濁する*5。

(4) 接種; seedlings を移植した inoculation pouch 1個あたり、20ml (プラントボックス) / 50ml (ラストロウェア) をパーミキュライト全面に、まんべんなくまわし掛ける。蓋をして、growth chamber (16h Light/ 8h Dark, 25-26℃)内に静置する。数日後、移植した seedlings が安定したら、蓋をはずし(または、少しずらし)通気をよくする*6。数日おきに pouch 下段をチェックし、水が枯れないよう注意する。

【注意事項】

*1; ラストロウェアの蓋はポリエチレン製で、autoclave すると溶けてしまうので使用しない。最近、抗菌グッズばやりのなかで、プラスチック製品の抗菌化が進んでいるので、容器(特に料理用などの、家庭仕様のもの)購入の際は、抗菌化の有無を確認した方が良い。

*2; 窒素固定研では、綿/レーヨン(50/50)、直径7-8mm程度のロープ(ホームセンターなどで、10m, 600-700円程度)を使用している。長期間の使用により、結び目部分から緑藻類がわきやすいので、使用後は

速やかに水道水で洗浄し、風乾すると良い。

- *3; ラストロウェア autoclave の際は、アルミホイルで蓋する。
- *4; ピンセットで穴を開け、子葉がのぞくぐらい深さまで植えると良い。高密度での移植は植物体全体の生育の妨げとなるとともに、根が絡み合うことで、サンプリング時の支障となるため、さけた方が良い。ノザン用サンプリングなどにおいて、接種後短期間（5-14 日）でサンプリングする際は、ある程度まで生育した（根が十分に伸長し、側根が発達している）seedling を用いた方が良い。
- *5; Inoculation pouch 感染系において、根粒形成に有効な菌濃度は決定していない。大まかな指標として、 $OD_{610}=0.7-1.0$ 前後の菌培養液 150ml を洗浄後、500-1000ml に希釈して用いている。
- *6; ラストロウェアでは、接種終了後、pouch 上部をサランラップで覆い、輪ゴムでとめておく。数日後、seedling が落ち着いたら、サランラップを取り除き（または、ピンセット等でラップに穴を開け）、通気を良くする。

(3-4) スライドグラスを用いた感染実験... root hair curling 観察実験系

根粒菌接種及び Nod factor 処理により誘導される root hair curling を連続・経時的に観察できる実験系である。この方法の検討・確立は、丹羽忍（東京理科大）、河内宏（農業生物資源研）による。（丹羽、修士論文より）

接種装置の材料；スライドグラス、カバーグラス、シリコンコーティング剤（バスコーク・透明（高性能シリコン系充填剤） - セメダイン株式会社）、スライドガラスラック（ Staining jar, Kartell 355, autoclavable ）

- (1) 接種装置の準備；スライドグラス状に、シリコンコーティング剤を4点スポットした後、カバーグラスを押し当てガラスの隙間が 1.5-2mm 程度になるまで押しつぶす。そのまま静置し、完全に乾燥・結合させた後、煮沸滅菌（電子レンジ内、蒸留水中で 15min を 3 回）する。水気を切った後、乾熱滅菌器内（80℃）で完全に乾燥させる。
- (2) seedling 移植；(3-1-6a)で準備した根がしっかり伸長した seedling を、根を傷つけないようにガラスの隙間に挿入した後*1、スライドラックに立てる。ラックに nitrogen-free 液体培地を接種装置下端に接触するぐらいまでそそぎ入れる*2。growth chamber 内 (16h Light/ 8h Dark, 25-26℃) で 3-5 日間静置する。
- (3) 根粒菌接種・Nod factor 処理；根が十分に伸長したら(1-1.5cm)、ラック内の nitrogen-free 液体培地に根粒菌・Nod factor を懸濁する*3。growth chamber 内 (16h Light/ 8h Dark, 25-26℃) に静置し、経時的に根毛の屈曲を観察する*4。

【注意事項】

- *1;根・根毛を傷つけることなく、同調的に生育させることが重要である。Seedling は全長が 1cm 程度（根は 0.5cm 程度）のものを選ぶと、接種装置挿入の際、根が傷つきにくい。コントロールでも根毛の変形が認められることがまれにあるので、接種装置は使い捨てにし、ラックも洗浄・滅菌処理を十分に行うこと。
- *2;培地が接種装置の隙間に上がってくる。根と培地が接触しているのを確認すること。
- *3;接種源濃度は、根粒菌； 10^{6-7} cells/ml medium、Nod factor； $10^{-7}-10^{-9}$ M で、root hair curling が認められた。
- *4;上記の Nod factor 処理濃度で、処理後 6 時間後に根毛先端の肥大・変形が、1 2 時間後には根毛全体の屈曲・変形が認められた。（丹羽、修士論文より）

4. 使用培地組成

(1) YEM (for *Rhizobium*)

K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/L
NaCl	0.1 g/L
Mannitol	5.0 g/L
Na-Gluconate	5.0 g/L
Yeast Extract	0.5 g/L

Adjust to pH6.9

After autoclave, add 16% CaCl₂ 1μl/ml

(2) B&D Nitrogen-free nutrients (for *Lotus japonicus*)

Stock sol.	Chemical	Stock sol. conc.	g/L	Final conc.
A	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0M	294.1	1.0mM
B	KH ₂ PO ₄	1.0M	136.1	0.5mM
C	Fe-citrate	0.02M	6.7	10μM
D	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5M	123.3	0.25mM
	K ₂ SO ₄	0.5M	87.0	1.5mM
	MnSO ₄ ·H ₂ O	2mM	0.338	1.0μM
	H ₃ BO ₃	4mM	0.247	2.0μM
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1mM	0.288	0.5μM
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	4mM	0.100	0.2μM
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.2mM	0.056	0.1μM
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2mM	0.048	0.1μM

Add 1ml stock solutions to 2L of H₂O

Adjust to pH6.8

(3) 1/2 Nitrogen-free nutrients (Nifal)

Stock sol.	Chemical	Stock sol. conc.	g/50ml	Final conc.
1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0M	14.7	1.0mM
2	KH ₂ PO ₄	1.0M	6.8	0.5mM
3	Fe-EDTA	0.02M	0.42	0.01mM
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5M	6.17	0.25mM
	K ₂ SO ₄	0.5M	4.35	0.25mM
	MnSO ₄ ·H ₂ O	2mM	0.017	1.0μM
5	H ₃ BO ₃	4mM	0.012	2.0μM
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1mM	0.015	0.5μM
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.4mM	0.005	0.2μM
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2mM	0.003	0.1μM
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2mM	0.003	0.1μM

Add 1ml stock solutions to 4L of H₂O

Adjust to pH6.6-6.8

5. 参考データ

農業生物資源研・窒素固定研究室 growth chamber (Spot inoculation)

「EYELA 証明付植物インキュベーターアイラトロン(FLI-301N)」

蛍光灯 5 本点灯 / 壁面 $80\mu\text{E sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (25,000Lx)

東大総合文化研究科・生命環境・川口研 growth chamber (*in vitro* inoculation in glass tube)

「日本医科機械製作所 BIOTRON LH-100-RDS」

蛍光灯 1 本点灯 / 壁面 $30\mu\text{E sec}^{-1} \text{m}^{-2}$

蛍光灯 3 本点灯 / 壁面 $100\mu\text{E sec}^{-1} \text{m}^{-2}$