

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) 基本実験系マニュアル (2005 年 3 月改訂新版)

1999 年 4 月より、ミヤコグサホームページにて、ミヤコグサの基礎実験系マニュアルを公開して以来、5 年以上が経過しました。この間、日本国内でのミヤコグサ研究人口も増え、それに伴い、新しい実験系の検討、基礎実験系の改良が進みました。前マニュアルでは、植物の栽培技術・交配法・根粒菌接種法が中心でしたが、改訂新版では、根粒菌及び菌根菌の接種法・感染追跡法、植物・根粒菌の遺伝子解析法等を、日本国内の複数の研究室より提供していただき、さらに充実したマニュアルを作成することを目的といたしました。紹介されている実験法において、疑問・質問のある方は、それぞれの項目の担当者に連絡していただき、さらに理解を深めていただけたらと思っております。また、本マニュアル作成にあたり、ご協力いただいた方々に心より感謝いたします。

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ
〒305-8602 つくば市観音台 2-1-2
Tel&Fax 029-838-8377
onko@nias.affrc.go.jp

〔執筆及び情報提供してくださった方々〕

河内 宏（農業生物資源研究所）
村上 泰弘（農業生物資源研究所）
小林 恵美子（農業生物資源研究所）
中澤 秀雄（農業生物資源研究所）
田畑 哲史（かずさ DNA 研究所）
浅水 恵里香（かずさ DNA 研究所）
笹本 茂美（かずさ DNA 研究所）
妹尾 啓史（三重大学生物資源学科）
秋山 康紀（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科）
内海 俊樹（鹿児島大学理学部）
森畑 宣幸（鹿児島大学理学部）
中武 壮以知（鹿児島大学理学部）
南澤 究（東北大学生命科学研究科）
三井 久幸（東北大学生命科学研究科）
板倉 学（東北大学生命科学研究科）
林 誠（大阪大学大学院工学研究科）
前川 隆起（大阪大学大学院工学研究科）
佐伯 和彦（大阪大学大学院理学研究科）

ミヤコグサマニュアル目次

1. ミヤコグサ種子播種法

- 〔1〕 サンドペーパー前処理による種子播種法
- 〔2〕 硫酸処理による同調的種子発芽法
- 〔3〕 サンドペーパー前処理・次亜塩素酸処理による種子滅菌・発芽法
- 〔4〕 種子播種法

2. ミヤコグサ栽培法

- 〔1〕 温室での一般的植物栽培法～種子収穫法
- 〔2〕 ミヤコンを用いたミヤコグサの大量栽培法
- 〔3〕 害虫・病原菌対策（農薬情報）

3. 人工交配法

4. 根粒菌接種法

- 〔1〕 Inoculation pouch システムによる根粒菌接種法
- 〔2〕 Slant 寒天培地システムによる根粒菌接種法
- 〔3〕 Spot inoculation 法
- 〔4〕 根粒菌接種法—Pillow（お茶パック）システム—
- 〔5〕 LacZ 根粒菌による感染経路追跡法

5. 菌根菌接種法

- 〔1〕 菌根菌接種法（三重大 version）
- 〔2〕 アーバスキュラー菌根菌共生実験法（大阪府大 version）

6. ミヤコグサ遺伝子解析法

- 〔1〕 DNA 抽出法
- 〔2〕 RNA 抽出法

7. 根粒からの根粒菌分離法

8. 根粒菌遺伝子解析法

- 〔1〕 根粒菌 DNA 抽出法
- 〔2〕 根粒菌 RNA 抽出法
- 〔3〕 RT-PCR による根粒菌遺伝子発現解析法
- 〔4〕 Conjugation による根粒菌への遺伝子導入法

9. 植物用培地組成一覧

10. 根粒菌用培地組成一覧

1. ミヤコグサ種子播種法

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ
onko@nias.affrc.go.jp

ミヤコグサの種皮は堅く、播種前に種皮に傷をつけ、吸水させる必要がある。種子播種法としては、目的別に下記の3法を使い分けると良い。

@温室栽培を目的とし、種子数が多く、種子の状態が良い：サンドペーパー前処理法

@種子数が多く、種子の状態が良く、一度に大量の種子を播種する：硫酸法

@種子数が限られ、種子の状況に応じた種子処理が必要とされる：次亜塩素酸法

〔1〕 サンドペーパー前処理による種子播種法

〔準備するもの〕

植物

ミヤコグサ *Lotus japonicus* 種子

Gifu B-129 の場合、0.12g=100 種子

Miyakojima MS-20 の場合、0.14-0.15g=100 種子を目安とする。

器具

サンドペーパー（240, 320, 400 番等, 2cm×2cm にカットしておく）

乳鉢（直径 10cm 程度の小ぶりなものが良い）

種子吸水用チューブ（エッペンドルフチューブ 2ml、FALCONE 2059, 2070 等、種子数に応じて）

蒸留水

シェーカー・シーソー等

ピンセット

〔方法〕

1. ミヤコグサ種子 20 個程度を乳鉢にとり、サンドペーパーを乳鉢に擦りつけるようにして、種皮表面に傷をつける*1。すべての種子の擦れ具合を均等にするため、1 回あたりの乳鉢で擦る種子数（1 セット）は、20-30 個とする。
2. 擦った種子をチューブに入れ、蒸留水を注ぎ、吸水させる。
3. 植木鉢に播種する（詳細は〔4〕参照）。

*1 1 セットあたりの種子数が 30 個を越えると、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。幾度かサンドペーパー処理を行い、「自分の擦り具合の目安」を見極めると良い。

〔2〕 硫酸法による同調的種子発芽法

硫酸処理により、種皮に傷がつき、同調的な吸水・発芽処理を行うことができる。状態が良く、種子数の多いサンプルの播種に適している。野生種子に比べ種皮の薄い種子（栽培環境が悪かったものや変異体種子）等では、処理中に種子内部まで硫酸が浸透してしまうため、本法は適さない（〔3〕の次亜塩素酸法を用いると良い）。

〔準備するもの〕

試薬

濃硫酸

滅菌蒸留水

器具

種子処理用チューブ（種子の個数に応じて）
シェーカー・シーソー等
ピンセット

〔方法〕

1. 種子を容器に取り分け、濃硫酸を加え、15-20分処理する。
2. 滅菌終了後、速やかに濃硫酸を捨て、滅菌蒸留水を加えて、vortex で数回しっかりと混和する。新しい滅菌蒸留水に交換後、shaker にてゆっくりとゆすり、15-20分ごとに蒸留水を交換し、2時間前後洗浄・吸水を行う。
3. 吸水し膨潤した種子を、水寒天プレートに、ピンセットで播種し、グロースチャンバー内で1週間前後栽培する。幼苗となった段階で、以降の栽培目的に合わせ植え替えを行う。

〔3〕 サンドペーパー前処理・次亜塩素酸処理による種子滅菌・発芽法

本法は、本来は、長期無菌条件下での栽培を目的とした種子の滅菌法であるが、滅菌条件を穏やかにすることで、種子数が限られる場合（交配により得られた F1 種子等）や、あまり状態の良くない種子（種子が小さい、カビが付着している等）などを確実に播種・発芽させたい場合にも応用できる。種子処理後は、寒天培地・滅菌したパーミキュライト等に播種し、幼苗がしっかり育ち上がるまでグロースチャンバー内で栽培した後、栽培・実験目的別に植え替えを行う。

〔準備するもの〕

試薬等

次亜塩素酸（有効塩素濃度 5-13%のもの、4□で保管）
Tween20
滅菌蒸留水
滅菌用溶液（2%次亜塩素酸（有効塩素濃度）、0.02% Tween20）

器具

乳鉢、サンドペーパー（上記参照）
滅菌用チューブ（FALCON2059, 2070等、種子の個数に応じて）
ボルテックス、シェーカー・シーソー等
ピンセット

〔方法 1——種子滅菌法として〕

1. ミヤコグサ種子 20 個程度を乳鉢にとり、サンドペーパーを乳鉢に擦りつけるようにして、種皮表面に傷をつける。すべての種子の擦れ具合を均等にするため、1回あたりの乳鉢で擦る種子数は、20-30個とする。
2. 滅菌溶液を準備する。一度に滅菌する種子数が100個前後の場合は、FALCON2059に3-4ml、200個を超える場合はFALCON2070に10-15mlの滅菌溶液を準備する。
3. 擦った種子を滅菌溶液に入れ、ボルテックスで数回（1回5秒程度）しっかりと混和する。その後シェーカー・シーソー等にのせ、ゆっくりとゆすりながら10分間滅菌処理する。
4. 滅菌終了後、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、ボルテックスにて数回混和・洗浄する（この過程で、チューブ壁面に付着している次亜塩素酸も洗浄する）。すぐに洗浄液を捨て、新しい蒸留水を加え、シェーカー等でゆっくり震盪し、洗浄する。20-30分ごとに新しい蒸留水に交換し、最低で2時間以上の洗浄・種子吸水を行う。
5. 吸水し、膨潤した種子を、無菌条件下で、水寒天プレート、フロリアライト（播種法参照）

などに播種し、グロースチャンバー内で一週間前後栽培する。幼苗がしっかり育ち上がった
ら、実験・栽培目的に合わせ植え替えを行う。

〔方法 2——穏やか条件での種子播種法として〕

状態の良い種子に比べ、種皮の擦り加減を若干弱めにするか、滅菌に用いる時亜塩素酸濃度を抑さ
えることで、穏やかな種子処理を行うことができる。確実に発芽させたい種子処理には本法が最適で
ある。

1. 種子を擦る。より目地の細かい(320, 400 番等)のサンドペーパーを用い、状態の良い種子に比
べ、穏やかに擦り、種皮に傷をつける。
2. 滅菌溶液も、有効塩素濃度を 1-1.5% 程度まで下げ、種子の状態を見ながら滅菌時間も調整
する(急激な種子膨潤、種子内部の露出などが見られた場合は、速やかに洗浄工程に入る)。
3. 洗浄は、種子が吸水するまで、O/N で行うことも可能である。十分に吸水し、種皮が脱落し
かけた種子は、ピンセットで種皮を除去したうえで、種子をピンセットでそっとつまみとり、
播種する(種皮を除去することで、種皮にトラップされて正常に発芽できない種子数が減少
し、発芽率の向上につながる)。

〔4〕 種子播種法

播種後、栽培・実験目的に応じて、播種スタイルも異なる。ここに代表的な例をいくつか挙げる。

(1) 植木鉢への播種

〔準備するもの〕

栄養土(クレハ培土「パワーソイル」、くみあい園芸用育苗培土等)

パーミキュライト

植木鉢(2~4号鉢等、栽培目的に応じて選ぶ)

〔方法〕

植木鉢の底に 1cm 程度のパーミキュライトを敷き、8分目まで土を入れ、十分に吸水させる。植
木鉢の土表面にピンセット等で 5mm 程度の孔を開け、吸水により膨潤して一回り程度大きくな
った種子を播種する。土をかけ、パーミキュライトで薄く土表面を覆い、水を播いてなじませる。

(2) 水寒天プレートへの無菌播種

〔準備するもの〕

試薬・溶液

寒天末(幼苗の根の伸長に適・不適な寒天として下記の報告がある)

@適合寒天: Difco Bacto Agar、ナカライ寒天末 01028-85 (500g)

和光寒天末、岩井化学寒天

@不適合寒天: INA Agar、TAKARA アガロース L03

窒素フリー液体培地

蒸留水

器具・装置

ビニールテープ・サージカルテープ (Miripore™ 3MM)

グロースチャンバー (生物研では、EYELA 照明付き植物インキュベーターアイラトロン
(FLI-301N)を使用)

〔方法〕

寒天濃度 0.7-0.9%になるように、蒸留水あるいは窒素フリー液体培地に加え、オートクレーブ後、
プレートを準備する。種子処理後、種皮を除去した種子をピンセットでそっとつまみ、プレート
上に播種し、シャーレをビニールテープあるいはサージカルテープでシールし、グロースチャン

バーで栽培する（Spot inoculation などまっすぐに伸長した根が必要な場合は、プレートを立てて栽培する）。

(3)フロリアライトへの無菌播種

しっかりと根の張った幼苗を育て上げたい場合は、フロリアライト（バーミキュライトと繊維素材からなる特殊土壌）に播種すると良い。

〔準備するもの〕

フロリアライト 552（製造元：日清紡、販売元：旭テクノグラス株式会社）

蒸留水

窒素フリー液体培地

ビーカー

薬匙

播種用プレート（9cm シャーレ、6穴プレート等）

〔方法〕

必要量のフロリアライトをビーカーに入れ、フロリアライト1ブロックあたり 40ml の蒸留水あるいは窒素フリー液体培地を加え、良く湿らせた後、オートクレーブにて滅菌する。表面殺菌した薬匙などで、フロリアライトをすくい取って、播種用プレートにまんべんなく、繊維を押しつぶし過ぎないように敷き詰め、種子処理後、種皮を除去した種子を、ピンセットで播種する。プレートをテープでシールし、グロースチャンバー内で、1-2週間栽培する。幼苗が育ち、発達した根がプレート裏面から確認できるまでになったら、栽培・実験目的に合わせ植え替えを行う。この時、根圏に入り込んだフロリアライトを抱き込ませたまま植え替えると、根へのダメージも少なく、以後の植物体の生育もよい。

2. ミヤコグサ栽培法

〔1〕温室での一般的植物栽培法～種子収穫法

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ
onko@nias.affrc.go.jp

ここでは、温室及びグロースチャンバーでの植木鉢による栽培法について紹介する。

〔栽培環境〕

温室：16h Light/8h Dark、気温 25℃、湿度 70%で栽培するのが望ましい。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。補光灯下や、4月～9月の天然光の強い時期には、高温・乾燥のため植木鉢に直接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、幼苗をある程度まで育て上げてから（播種法参照）、植木鉢に移植し栽培するのが望ましい。

グロースチャンバー：16h Light/8h Dark(鉢上げまでの幼苗栽培や根粒菌接種：60-100 $\mu\text{E sec}^{-1}\text{m}^{-2}$ 、種子収穫を目的とする場合：250 $\mu\text{E sec}^{-1}\text{m}^{-2}$ 程度)、気温 25℃、湿度 70%で栽培するのが望ましい。MG-20 Miyakojimaの場合、グロースチャンバー内で、開花・種子収穫も可能であるが、B-129 Gifuの場合は、水銀灯などにより自然光に近い、強光下で栽培しないと開花できない（したがって、より大型の人工気象器が必要である）。

〔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。

〔種子収穫法〕

ここでは1植物個体から数百個以上の種子を収穫する方法について紹介する。

〔準備するもの〕

紙封筒（封筒底の糊目をビニールテープで補強し、種子がこぼれないようにする、
TOKYO BUSINESS ENVELOPE 定型 90*205mm（長4・筋入）使用）
ビニールテープ
網ざる（料理等に使う小ぶりなざるが便利）
ピンセット
種子保存用チューブ（エッペンドルフチューブ、FALCONE チューブ等）

〔方法〕

1. 種子収穫の目安は、(1) 莢が茶褐色に変色し、(2)表面の手触りががさつく感じになり、(3)萼が完全にひからびた状態になる、の3点である。莢を付け根から丁寧にむしり取り、紙封筒に入れ、乾燥条件で1-2週間十分に乾燥させる(封筒内で莢がはじける音が聞こえ始めたら、十分に乾燥した証拠)。
2. 乾燥した莢を網ざるに入れ、莢の開裂により放出された種子を回収する。その後、莢の中に残っている種子をピンセット等で集める。
3. 種子を保存用のチューブに入れ、チューブの蓋に空気抜き用の孔をあけ、乾燥器内、あるいは4℃で保管する。

〔2〕ミヤコンを用いたミヤコグサの大量栽培法

笹本茂美
かずさ DNA 研究所
sasamoto@kazusa.or.jp

シロイヌナズナ用に開発された Arasystem をミヤコグサの栽培に利用する。本栽培法の特徴として、下記があげられる。

< 利点 > 狭い面積に多種類の個体を栽培できる

< 欠点 > 一鉢に 2 個体が限度であり、生育が悪く（ストレスを受けやすいためと思われる）、少ない種子しか収穫できない。

〔準備するもの〕

栽培システム

アラコン（ビーエム機器（株））

ASN01 [スターターキット] 1 プレート（51 苗）X7 プレート（定価 70000 円）

ASN02 [アラコン] チューブ・カセット各 720 個（定価 112000 円）

ASN03 [アラチューブ] チューブのみ 360 本（定価 47000 円）

ASN04 [アラフラット] 鉢プレート 160 枚（定価 42000 円）

ASN05 [アラトレイ] 水受けトレイ 60 枚（定価 55000 円）

ASN06 [アラバスケット] 土用バスケット 3200 個（定価 30000 円）

ASN-MINI チューブカセット・単体ポット各 20 個（定価 6000 円）

試薬・土壌など

硫酸

蒸留水

パーミキュライト

パワーソイル

人工気象器（TOMY CFH405 など）

乾燥器（種子乾燥・保管用）

〔方法〕

（1）種子の前処理（硫酸）

1. 種子約 10 粒を 2ml マイクロチューブに入れ、濃硫酸 0.3-0.5ml を加える。
2. マイクロチューブミキサーで 20 分処理する。
3. 水洗いを 3 回行う。
4. 20-30 分水浸（水洗いに時間を要した場合は省く。種子が吸水しているかで判断）

（2）播種から採取まで

1. アラコンをセットする。パーミキュライトを底 1cm 程度入れ、その上にパワーソイルを入れ、あらかじめ水を十分に含ませる。
2. 前処理した種子を播種する。
3. 人工気象機 22 20hr（湿度 70%、照度 16000 ルクス）20 4hr（湿度 70%、照度 0 ルクス）
4. 本葉が出て、2-3cm にまで生長したら間引きを行い、2 個体程度にする。
5. 5cm 程に生長したら、カバーをかける。（ピンセットを使って、真ん中の穴を通す）
6. 10cm 程度に生長した段階で、セロファンの筒をセットする。
7. 播種から 30-40 日後から 1 週間に 1 回、2000 倍希釈ハイポネックスを与える。
8. 莢が茶色変色し、表面が渴いたら採取する。
9. 2ml マイクロチューブに莢ごと入れ、ふたに穴をあけ、乾燥機に保存する。（莢をいれ過ぎないように注意する。1 本に 4-5 本が限度）



参考データ：アラコンによるアラビドプシス栽培。ロゼッタ葉が展開したところで、カバーをかけ、栽培する。

〔3〕害虫・病原菌対策（農薬情報）

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所 生理機能研究グループ
onko@nias.affrc.go.jp

ミヤコグサ栽培時には、随時農薬散布による害虫対策を行う必要がある。以下に、生物研で使用している農薬名を紹介する。

殺虫剤		効果のある害虫
	スミチオン（乳剤）	ガの幼虫、アブラムシ
	トレボン（乳剤）	ガの幼虫、アブラムシ
	アディオン（乳剤）	ガの幼虫、アブラムシ
	ポルスタール（乳剤）	スリップス
	スプラサイド（乳剤）	コナジラミ
	アクテリック	コナジラミ
	ニッソランV（乳剤）	ダニ
	ダニトロン	ダニ
	コロマイド	ダニ
殺菌剤		効果のある病原菌
	ダコニール乳剤	うどん粉病菌等

害虫が発生する前から、予備的防除として、1・2週間ごとに、農薬散布すると良い。温室などで害虫の大発生が起こった場合は、温室を空にして掃除をした後、温度設定を 40-50 に上げ、一日程度おき、残っている害虫を駆除することもできる。

3. 人工交配法

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ
onko@nias.affrc.go.jp

ミヤコグサは蝶形花であり、正面上部に旗弁(standard petal)、左右側面に翼弁(wing petals)、正面下部に雄蕊・雌蕊を包む2枚の竜骨弁(keel petals)からなる(図1)。ミヤコグサは自家受粉花であり、開花時にはすでに受粉が完了している(図1,3)。したがって、開花前の蕾を開き、花粉が放出される前の未成熟な雄蕊を除去する必要がある。開花前の蕾は小さく、雄蕊・雌蕊は竜骨弁で覆われているため、これらを傷つけることなく除去する作業には、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日にわけて行う。

〔準備するもの〕

試薬

70%(v/v) エタノール (花粉不活化用)

器具

電子顕微鏡用ピンセット；先端の鋭利なもの。雄蕊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)

拡大鏡

綿棒(ペーパ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)

スプレー容器(花粉不活化アルコール用)

FALCON 2059(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)

サージカルテープ

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・グレー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 FALCON 2059 チューブをビニールテープで留めつける。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(図5)。

〔作業1--1日目；交配用蕾の選抜、雄ずいの除去、交配花保護〕

1. 交配花選抜；掛け合わせには stage4 の蕾(図2)が最適である。
2. 竜骨弁の除去；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。そのまま、斜め上方に引き抜く感覚で、竜骨弁を除去する。*3
3. 雄蕊の除去；露出した雄蕊(袋状の葯が10個確認できる)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*4。残っている翼弁と旗弁で雌蕊をそっと覆う。
4. 交配花保護器設置；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 TCPN)をスプレーし*5、交配花保護器で覆う。

〔作業2--2日目；花粉収集、交配〕

1. 花粉の収集；開花している花粉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。約10-20個前後の竜骨弁を集める。竜骨弁の付け根部分の一端を左手で軽くつまみ*6、エッペンドルフチューブの外壁面に添わせるようにして押さえ、ピンセットでもう一方の付け根を右側の引っ張ると、竜骨弁先端に溜まっていたカートリッジ状の花粉が、チューブ内に落下するので、これを集める。(熟練したら)花粉親の花をつまみ取り、旗弁と翼弁を除去す

る。親指と人さし指で竜骨弁先端を少しづつ圧迫すると花粉が出てくる。出てきた花粉を指で軽くつぶす。これを直接交配に用いる。

2. 交配；前日雄蕊を除去した雌親の蕾では、除去時に比べ、雌蕊が発達・成熟して、まっすぐ伸長した状態になっている（図3、stage5の状態）。花粉を綿棒にとり、雌蕊先端の柱頭にそっとまぶしつけ受粉する*7（押し出した花粉を使う場合は、花粉を直接雌蕊に間夫しつける）。受粉終了後、残っている翼弁で雌蕊部分をそっと覆う。ビニールテープに花粉親・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。

- *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、雌蕊が通っているので、ピンセットで傷つけないよう丁寧に扱う。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。雌蕊に損がなければ、丁寧に花弁を取り除き、以後の交配に使用できる。
- *4 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薬は、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。
- *5 雄蕊除去後、長時間放置しすぎると、雌蕊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。
- *6 カートリッジ状に詰まっている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。
- *7 この段階で、雌蕊がstage4のまま（先端が屈曲している）のものは、雄蕊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。雌蕊がstage5の段階まで成熟しているもの（先端が伸長している）を交配に用いる。



図1 ミヤコグサの花(右は花弁を分解したもの)。左から竜骨弁(先端に花粉がたまっているのがわかる)、翼弁、旗弁から構成される。開花時すでに、花粉は葯から放出され、自家受粉が成立している。バーは1cm。

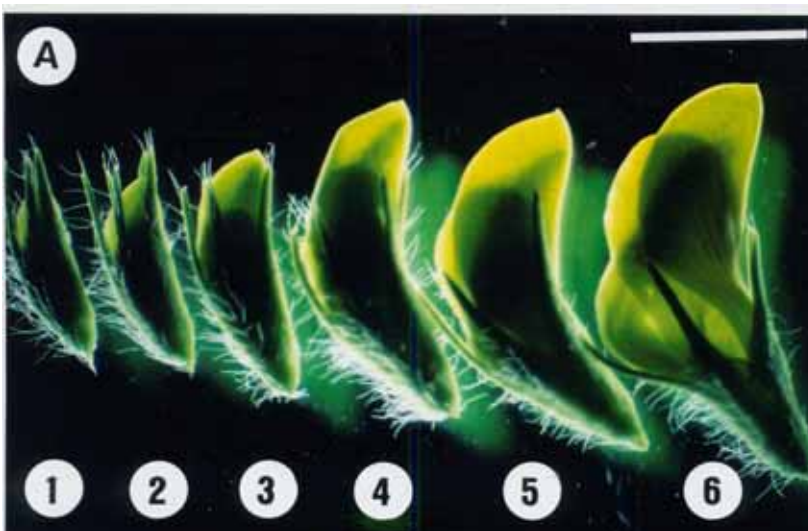
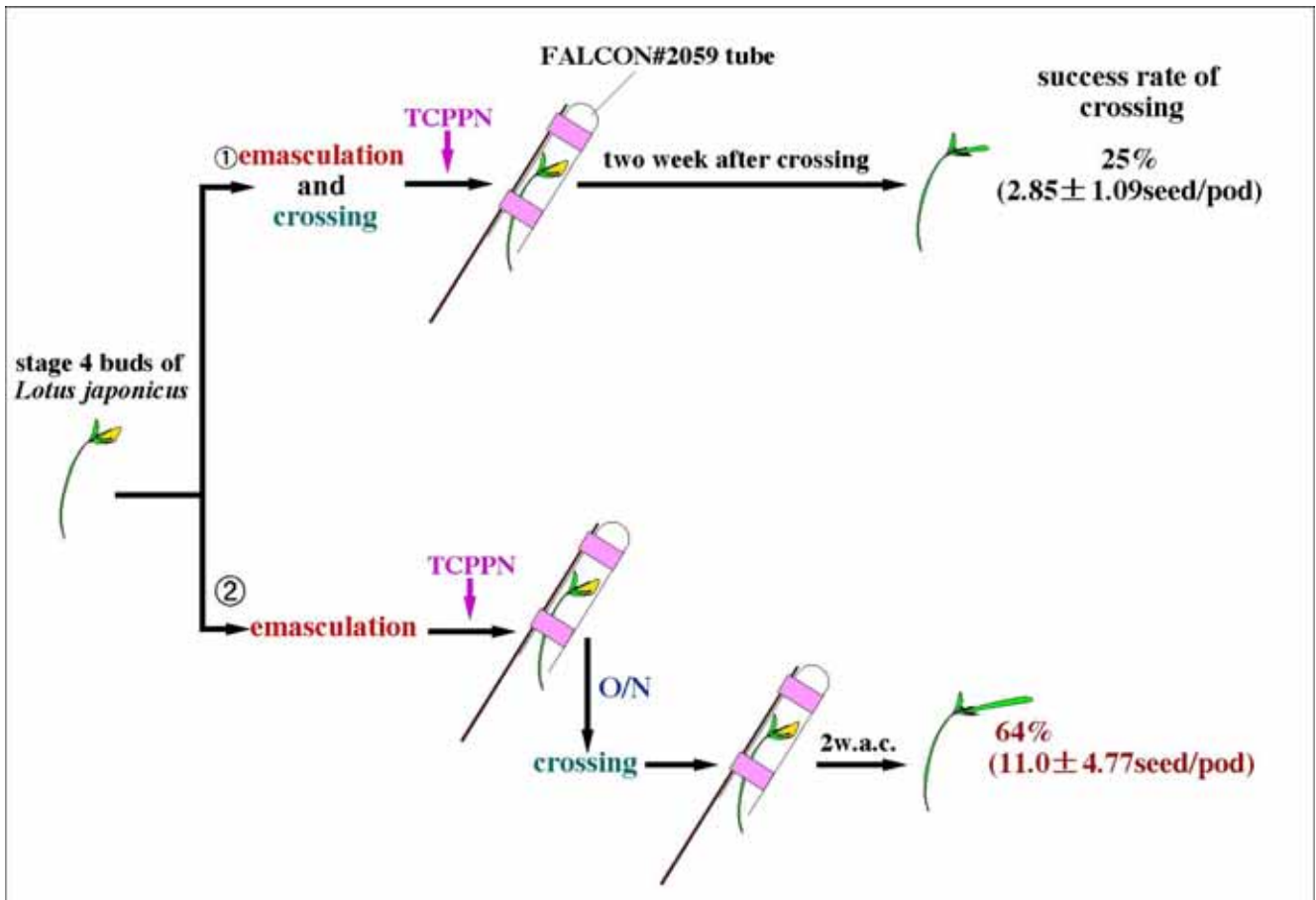


図2 蕾発達ステージ。Stage4 が交配に適している。バーは1cm。



図3 stage4, 5, 6の花の内部構造。Stage 5では、矢印で示した葯から花粉の放出が始まっている。Stage6では自家受粉が完了している。そこで、stage 4の蕾から雄蕊を除去し、翌日、雌蕊がstage 5の段階まで成熟するのを待って、交配を行う。バーは5mm。



参考データ 一日交配と、二日交配での成功率。交配後、花は交配花保護器（竹串と FALCON 2059 で作成）で保護、二週間後の莢形成率および収穫できた F1 種子数を比較した。

4. 根粒菌感染法

〔1〕Inoculation pouch システムによる根粒菌感染法

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ
onko@nias.affrc.go.jp

本法は、ノザン及びマクロアレイ解析用根粒サンプルの採取に適した方法である。多数の根粒を着生させたい場合は、接種に用いる幼苗がしっかり根を張るまで、ある程度育て上げてから根粒菌を接種すると良い。

〔準備するもの〕

植物・根粒菌

播種処理（次亜塩素酸法）したミヤコグサ種子

根粒菌（液体培地で培養したもの）

培地

根粒菌培養用液体培地（TY, YM, YEM 等）

窒素フリー液体培地

器具・装置

Inoculation pouch の材料

プラスチックケース；オートクレーブ可能な物、生物研では下記を使用

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.）

ロープ；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

パーミキュライト

ピンセット

遠心用チューブ

〔Inoculation pouch の準備〕

装置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。

（1）1個のプラスチックケース（装置上段にあたる）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が残し、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（装置下段にあたる）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。

（2）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*1。これまでの工程により、ロープを經由して、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 をオートクレーブする。

〔方法〕

1. Inoculation pouch に播種処理した種子をピンセットで5mm程度の深さに植え込む。1pouchあたり～16seeds（プラントボックス）/～40seeds（ラストロウェア）を目安とする。水洗浄処理をO/Nで行った種子の場合は、種皮をピンセットで取り除いてから植えると、発芽率が良くなる。播種後、蓋をして、グロースチャンバー内で1～2週間前後栽培する*2。
2. 150ml 液体培地（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の窒素フリー液体培地に懸濁する。
3. inoculation pouch 1個あたり、20ml（プラントボックス）/50ml（ラストロウェア）の菌懸

濁液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 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*3。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。

- *1 ラストロウェアの蓋はポリエチレン製で、オートクレーブすると溶けてしまうので使用しない。代わりに二重にしたアルミホイルで蓋をする。
- *2 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。
- *3 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。



Inoculation pouch (プラントボックス使用)。ロープにより、下部の水が、上部の植物に供給される。写真は、種子播種後 50 日、根粒菌接種後 3 週間のミヤコグサ。

〔2〕 Slant 寒天培地システムによる根粒菌感染法

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ
onko@nias.affrc.go.jp

Slant 寒天培地上に根を伸長させることで、根粒菌の感染過程の経時的追跡が可能である。他の方法に比べ、無菌条件を維持しやすく、根粒菌変異株の接種実験などに適している。この感染方法では接種後7日目*1より根粒の着生が認められた。

〔準備するもの〕

植物・根粒菌

播種処理（次亜塩素酸法による）したミヤコグサ種子

根粒菌（液体培地で培養したもの）

培地

根粒菌培養用液体培地(TY, YM, YEM 等)

0.9%寒天 in 窒素フリー培地；ガラスチューブに 0.9%(w/v) 寒天を含む窒素フリー培地 20ml 入れ、スラント状寒天培地を作る。

0.7%水寒天プレート（幼苗栽培用）

器具・装置

ガラスチューブ（150mm× 24mm）

エッペンドルフチューブ

ピンセット

〔方法〕

0. スラント培地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幼苗が必要である。0.7%水寒天（9cm シャーレ）あたり、50-60 個の種子を等間隔に播種後、テープでシールし、シャーレを垂直に立て、25-26℃ で 2-3 日栽培する。根がすんなりと伸びた幼苗のみを選抜し、接種実験に用いる。
1. 液体培地で根粒菌を培養する。28℃, 160rpm, 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/200・l 菌懸濁液となるように希釈する（*Mesorhizobium loti* JRL501 の菌濃度は OD₆₁₀=1.0 1×10^{10} bacteria を基準とする）
2. スラント状寒天培地を低温下で保管しておく、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。この水に、菌懸濁液 200・l 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、1. で準備した、幼苗を寒天培地上に幼苗の根を寒天表面に添わせるように置き、菌懸濁液と幼苗の根をなじませる。接種終了後、チューブの幼苗の胚軸から下の部分をアルミホイル等できぐるんで遮光し、growth chamber 内で栽培、感染過程を観察する。

*1 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。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。

〔3〕 Spot inoculation 法

今泉（安楽）温子
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ
onko@nias.affrc.go.jp

根粒形成初期過程を経時的に観察・サンプリングする際に有効な実験系である。Nod factor 処理による根粒原基形成誘導の観察法として用いることもできる*1。

〔準備するもの〕

植物・根粒菌

播種処理（次亜塩素酸法による）したミヤコグサ種子

根粒菌（液体培地で培養したもの）

培地・試薬

spot inoculation 用寒天培地；滅菌二号角シャーレ(EIKEN KIZAI Co., LTD)1枚あたり、35-40mlの0.9%(w/v)寒天 in 窒素フリー培地を入れ、培地プレートを作成する。

黒インク(Pilot Black ink)

低融点アガロース (Sea Plaque^(R) GTG^(R) Agarose, FMC Bio Products)；1%(w/v)低融点アガロース溶液をつくり、オートクレーブ滅菌しておく。

根粒菌培養用液体培地(TY, YM, YEM 等)

器具

滅菌二号角シャーレ(EIKEN KIZAI Co., LTD)

サージカルテープ(MicroporeTM, 3M)、ビニールテープ

アルミホイル、黒画用紙など、根の部分を遮光するもの

P10 ピペットマン（チップも先端が極細のものを使用するのが望ましい）

エペンドルフチューブ

〔方法〕

1. スラント寒天培地への接種法と同様、0.7%水寒天プレートに、次亜塩素酸滅菌処理した種子を植え、垂直に立ててグロースチャンバー内で栽培し、根がまっすぐ伸びた幼苗を選抜する。
2. spot inoculation 用寒天培地に、1.で選抜した幼苗を、根を寒天表面に添わせるよう移植する（1プレートあたり10-15本）。プレート上部の一部分、5cm程度をサージカルテープでとめ*2、残りの部分はビニールテープでシールした後、幼苗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、グロースチャンバーで5-7日間栽培する。
3. 根粒菌を液体培地で培養する。28℃, 160rpm, 培養開始後2-3日目の菌培養液1mlをエペンドルフチューブにとり、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・lの滅菌蒸留水に懸濁する*3。これに、50・l黒インク(Pilot Black ink)を加え、ピペッティングにより混和する。
4. 1%(w/v)低融点アガロース溶液を電子レンジで溶かし、人肌まで冷ます。アガロース溶液50・lをエペンドルフチューブにとり、ここに25・lの接種菌溶液（含黒インク）を加え、ピペッティングにより混和する*4。
5. 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・l用)を装着し、4.で準備した菌寒天液を10・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、菌寒天溶液が付着する

よう、丁寧にスポットする*7。スポットされた菌寒天溶液は、丸いボール状になる。接種終了後、プレートをビニールテープでシールし*8、根の部分をホイルでくるみ、垂直に立てた状態で、グロースチャンバー内で栽培し、感染過程を追跡・サンプリングを行う。

- *1 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）。
- *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、 $OD_{610}=0.7-1.0$ 前後の菌培養液 1-2ml を洗浄後、 $200 \cdot 1$ 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、菌寒天液が根表層にとどまらずに流れやすくなる）。根の伸長過程においても、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、菌寒天液が流れにくい。このような根を準備するためには、(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 先端に菌寒天液を少し押し出す。
 - * EH zone に tip を近づけ、押し出した菌寒天液と EH zone の根毛を軽く接触させ、接種の「足場」をつくる。
 - * 菌寒天液をさらに押し出し、「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、ボール状になる。1 個のボールは菌寒天液 $3 \cdot 1$ 程度である。
- *8 長期間プレートを静置すると、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。

〔4〕根粒菌感染法 pillow (お茶パック) system

前川 隆紀
大阪大学大学院工学研究科応用生物工学
takakim1@bio.eng.osaka-u.ac.jp

pillow system は省スペースで効率的に根粒菌を感染でき、土の付着がほとんどなく、顕微鏡観察に適している。本研究室では1トレイあたり50本のミヤコグサを培養している。

〔準備するもの〕

植物・菌株

ミヤコグサ *Lotus japonicus* 種子

ミヤコグサ菌

材料・器具

お茶パック

(出来るだけ表面が滑らかなもの、本研究室では「かおりちゃんお茶だしパック L40 枚〔ポリエステル・ポリエチレン、寸法：120×95mm、オートクレーブ可〕」を使用)

バーミキュライト

パーライト

B&D N-free nutrients solution

KN₃ (ストック溶液を作っておくとよい。)

プラスチックトレイ (約 30×10×8cm)

ラップ (サランラップ等)

〔方法〕

1. バーミキュライトとパーライトを6：1で混合したものをパックにつめる。
(原著ではバーミキュライトと砂を6：1で使用。お茶パックでは砂がもれやすいため、パーライトを使用)
2. このパックを終濃度KN₃, 10 μMに調製したB&D液体培地に浸し*1、パックを直方体となるよう形を整える。形を整えたパックをプラスチックトレイに並べ、播種後約3日の芽生えをパック同士の隙間に植える。(パック間が密着しすぎると、根の発達が阻害されるので注意)。移植直後はパックが乾燥しやすいのでトレイをラップで覆う。
3. この状態で3日間培養した後、根粒菌を適当な溶液に懸濁し、1トレイあたり根粒菌約 $1 \times 10^6 \sim 8$ cell となるように接種する。この際に湿度の調整のためラップに爪楊枝などで穴をあける。ラップをしてから1週間目にこのラップを除く。その後、パックが乾いたらその都度、培地を補給する。

*1 その後、検討したところ B & D に 10 μM の KN₃ を加えると根粒形成を抑制せず、成長を促進し、結果として根粒形成数が増えることが確認できました。濃度は 50 μM ぐらいでも問題ないかもしれません。

(Reference) Szczyglowski et al. (1998) MPMI 11; 684-697

指定の大きさのトレイには11個のパックが入り、パック同士の間には5本ずつの芽生えを植えることができます。



〔5〕LacZ 根粒菌による感染経路追跡実験法

前川 隆紀
大阪大学大学院工学研究科応用生物工学
takaki1@bio.eng.osaka-u.ac.jp

GFP 根粒菌では観察しにくい感染系や根粒内ネットワークの観察が明視野で容易に行える。

〔準備するもの〕

植物・菌株

ミヤコグサ *Lotus japonicus* Gifu B-129 種子

lacZ 根粒菌 ML001(nodB::lacZ) (東北大学 南澤先生から譲渡されたもの)

試薬

X-Gal (nacalai tesque 05627)

N, N-Dimethylformamide (nacalai tesque 13016)

Glutaraldehyde (SIGMA, G 6257)

Potassium Hexacyanoferrate (III) (nacalai tesque 28605)

Potassium Hexacyanoferrate (II) Trihydrate (nacalai tesque 28608)

Chloral Hydrate (nacalai tesque 079-22)

Glycerol

Stock solution

1×PBS pH 7.0

20mg/ml X-Gal in N, N-Dimethylformamide (-20 保管)

50mM Potassium Hexacyanoferrate (III) in water (4 保管)

50mM Potassium Hexacyanoferrate (II) Trihydrate in water (4 保管)

固定液

0.5% Glutaraldehyde in 1×PBS

染色液

0.8mg/ml X-Gal

2.5mM Potassium Hexacyanoferrate (III)

1.5mM Potassium Hexacyanoferrate (II) Trihydrate in 0.2×PBS

(in 1×PBS でも問題なしと思われる)

抱水クロラール溶液

Chloral Hydrate (nacalai tesque 079-22) : Glycerol : DW = 8 : 2 : 1

器具・装置

染色用の容器 (15ml スミロンチューブを使用)

30 インキュベーター

〔方法〕

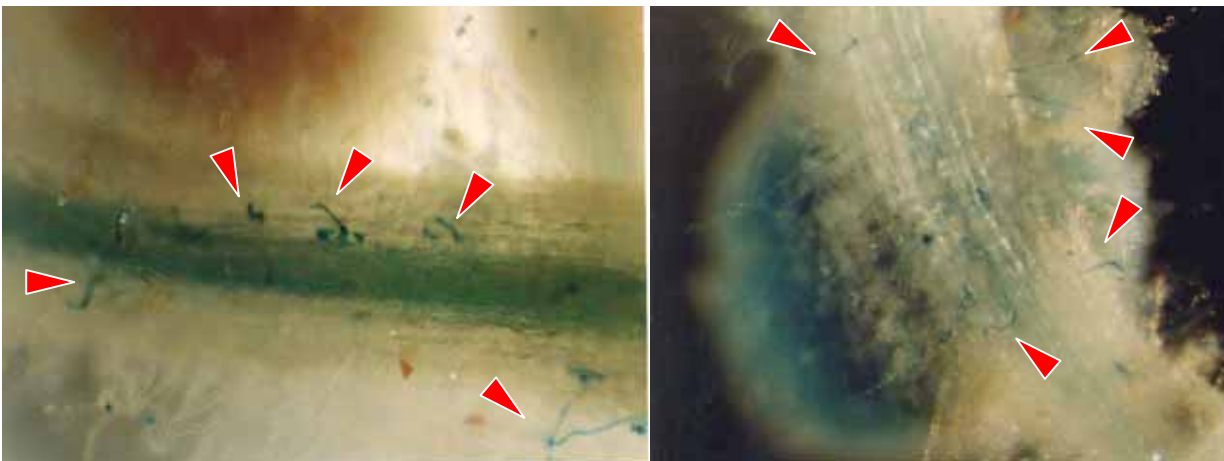
(1) 根粒菌の感染

根粒菌感染実験マニュアルに従い、根粒菌を接種したミヤコグサ実生を準備する。感染過程の目安として、感染系の形成は、根粒菌感染後約3日目後から観察することができ、感染後約7日後より肉眼で根粒が確認できる。

(2) X-gal を用いた染色

1. 固定液にサンプルを入れ、1-2分脱気した後、一時間室温でインキュベートする。この時のサンプルは小さく切らないほうがよい。
0. 1×PBSで3回洗う。
1. 染色液にサンプルを移し、1-2分脱気したのち、30分でインキュベートする。感染系を観察する際には1.5-3時間ほどインキュベートすることで見やすくなる(1)。また、パンブもしくは根粒を観察する際には3時間-1晩ほどでよいと思われる(感染根組織の透明化に関しては一度試しただけだが、染色後、抱水クロラールに一晩室温で放置したときにきれいな像を見ることができた)。

1 ミヤコグサ自身の LacZ 活性のため根が青く染まり、感染系が観察しにくくなるため。ミヤコグサ自身の LacZ 活性は主に root-tip, 中心柱、子葉の裏で見られるようです。



左図、右図とも 青く染まった感染系(赤い矢印)なお、ミヤコグサ自身の LacZ 活性により中心柱も青く染まっている。また、右図では後ろ側に根粒も見ることができる。