

日本産ヤマモガシ（ヤマモガシ科）のクラスター根の発見

山内大輝^a, 丸山隼人^b, 内田慎治^c, 向井誠二^c, 坪田博美^c, 和崎 淳^{a,b,*}

^a 広島大学総合科学部

^b 広島大学大学院生物圏科学研究科

^c 広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所

A New Finding of Cluster Roots Formed by *Helicia cochinchinensis* (*Proteaceae*) from Japan

Taiki YAMAUCHI^a, Hayato MARUYAMA^b, Shinji UCHIDA^c, Seiji MUKAI^c, Hiromi TSUBOTA^c
and Jun WASAKI^{a,b,*}

^aFaculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University,
1-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-8521 JAPAN;

^bGraduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
1-4-4, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-8528 JAPAN;

^cMiyajima Natural Botanical Garden, Graduate School of Science, Hiroshima University,
1156-2, Mitsumaruko-yama, Miyajima-cho, Hatsukaichi, 730-0543 JAPAN

*Corresponding author: junw@hiroshima-u.ac.jp

(Accepted on November 1, 2014)

Helicia cochinchinensis Lour. (*Proteaceae*) is distributed from southwest Japan to the Indochina Peninsula and is a rare species in Japan. We report here a new finding of cluster roots for this species from Japan. A morphological description of the cluster roots and physical analyses on soil properties including activity of acid phosphatase and soil pH in the vicinity of the trees are given.

Key words: Cluster roots, *Helicia cochinchinensis*, phosphate, *Proteaceae*, proteoid roots, rhizosphere.

ヤマモガシ科はオーストラリアや南アフリカなどの旧 Gondwana 大陸に広く分布する木本の双子葉植物で、約 80 属 1500 種から成り、高木から低木までである (Briggs 1995)。これまでに、ヤマモガシ科の *Banksia* や *Hakea* などの植物については、その生育土壌が極めてリンに乏しく、低リン環境に適応していることが示されている (Lambers et al. 2011)。またこれらの植物は、数 mm から 2 cm 程度の小根が密に集まりブラシ状の形状をとったクラスター根とよばれる特殊な形状の根を形成することが知られている (Skene

1998, 和崎 2006)。このクラスター根は、土壌中の難溶性リンを可溶化する有機酸と有機態リンを分解するホスファターゼの分泌能力が高いことで、土壌中で通常吸収されないリンを利用することができる (Neumann and Martinoia 2002, Wasaki et al. 2003)。この特性は、クラスター根を形成する植物にとって、リン吸収の主要な機構となっている。

ヤマモガシ科ヤマモガシ属 *Helicia* は日本の南部から中国南部、東南アジア、オーストラリア東部、太平洋諸島に約 90 種が分布する (Briggs ·

堀田 1995). このうちヤマモガシ *Helicia cochinchinensis* Lour. は、日本に唯一自生するヤマモガシ科植物で、静岡県以西の西日本の暖地に分布する(杉本 1984, 山本 2005, Morimura et al. 2006). ヤマモガシは広島県内では宮島(広島県廿日市市)や大黒神島(広島県江田島市)に自生することが知られている(関ほか 1975, 広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997). 宮島を含むこの地域の地質は花崗岩を母岩とし、栄養塩に比較的乏しい土壌である. とくにリンは、本研究における調査地点の可給態リンが $2.0\text{--}2.5\text{ mg-P kg soil}^{-1}$ (Olsen 法による実測値) 程度であり、西オーストラリアに見られる極めてリンに乏しい砂丘土壌における可給態リン ($0.5\text{--}1.5\text{ mg-P kg soil}^{-1}$; Lambers et al. 2012) と比較するとやや高いものの、農耕地における可給態リンの $1/100$ 程度と極めて乏しい. このことから、これまでに調査されている他のヤマモガシ科植物と同様に、ヤマモガシも低リン環境に適応している可能性が考えられる. しかしながら、その低リン環境に適応する機構の中でも重要であると考えられるクラスター根の形成の有無については、これまで調査されていなかった. そこで、宮島に生育するヤマモガシを材料とし、クラスター根の形成について調査を行い、クラスター根が存在することを確認した. また、このクラスター根の根圏土壌を採取して土壌 pH と酸性ホスファターゼ活性を調査し、土壌中のリンの可給化にクラスター根の機能が関与するかどうかについて調査を行った.

材料と方法

植物体と栽培条件

広島県廿日市市宮島町にある広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所内の植栽木(成木, 植栽後約 10 年)およびその周辺に自然に生じた実生を掘り起こし、クラスター根の有無を調査した. 同時に、DNA バーコーディングの際に比較に用いる枝も採集した. また、種子を採集し、バーミキュライトに播種後、適宜水を与えながら発芽させた. このようにして得た実生を、リンを含まない水耕培養液に移植し、水耕栽培を行った. 水耕培養液の組成は以下のとおりとした: $0.83\text{ mM NH}_4\text{NO}_3$, 0.38 mM KCl , $0.19\text{ mM K}_2\text{SO}_4$, 0.75 mM CaCl_2 , 0.82 mM MgSO_4 , $36\text{ }\mu\text{M}$

Fe(III)-EDTA , $36\text{ }\mu\text{M FeSO}_4$, $9.1\text{ }\mu\text{M MnSO}_4$, $46\text{ }\mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, $3.1\text{ }\mu\text{M ZnSO}_4$, $0.16\text{ }\mu\text{M CuSO}_4$, $7.4\text{ nM (NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. 培養液はエアレーションを行い、2 週間ごとに水耕液を交換しながら日長 16 時間、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ の恒温室で 5 か月間栽培を行った.

DNA バーコーディング

ヤマモガシ成木の根は土壌中で他の植物の根と混在していたことから、発見されたクラスター根が真にヤマモガシに由来するかどうかを判定するために、以下の方法で DNA バーコーディングを行った. ヤマモガシの葉およびクラスター根から Isoplant (Nippongene, Toyama, Japan) を用いて DNA を抽出した. 得られた DNA を鋳型として、葉緑体 *rbcL* (RuBisCO large subunit) 遺伝子を対象としたプライマーセット *rbcLa F* ($5'\text{-ATGTC ACCAC AAACA GAGAC TAAAG C-3'}$) と *rbcLa R* ($5'\text{-GTAAA ATCAA GTCCA CCRCG-3'}$) (CBOL Plant Working Group 2009) を用いて PCR を行った. PCR は TaKaRa Thermal Cycler Dice Gradient (Takara-bio, Otsu, Japan) および KOD FX (Toyobo, Tsuruga, Japan) または TaKaRa Ex Taq (Takara-bio) を用いて、以下の設定で反応を行った: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 4 分の変性の後、 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 30 秒、 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 1 分、 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 1 分を 35 サイクルで伸長反応を行った後、 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 10 分の伸長反応を追加してから $4\text{ }^\circ\text{C}$ で停止させた. 得られた PCR 断片は受託解析により塩基配列を決定し、両方向から得られた配列をつなぎあわせて葉と根の配列の比較を行った.

土壌の分析

非根圏土壌はヤマモガシ成木の生育する地点で植物の存在しない表層土壌から採取した. クラスター根の根圏土壌は、クラスター根に付着している土壌を軽く揺すって落ちるものを捨てた後、 50 mL 容ポリプロピレン製チューブ内で激しく振盪して根から脱落したものを根圏土壌とした. 非根圏土壌、根圏土壌ともに約 0.5 mm の篩でふるって大きな粒子や細根などを除去した後、土壌 pH の測定、ホスファターゼ活性の測定に供試した.

土壌 pH は、風乾土壌 1 に対して 2.5 倍量の水を加え、1 時間振盪した後に pH メーターで測定した. ホスファターゼ活性は、蛍光基質 4-methylumbelliferyl phosphate を用いた方法で測定した (Maruyama et al. 2012). 0.1 M

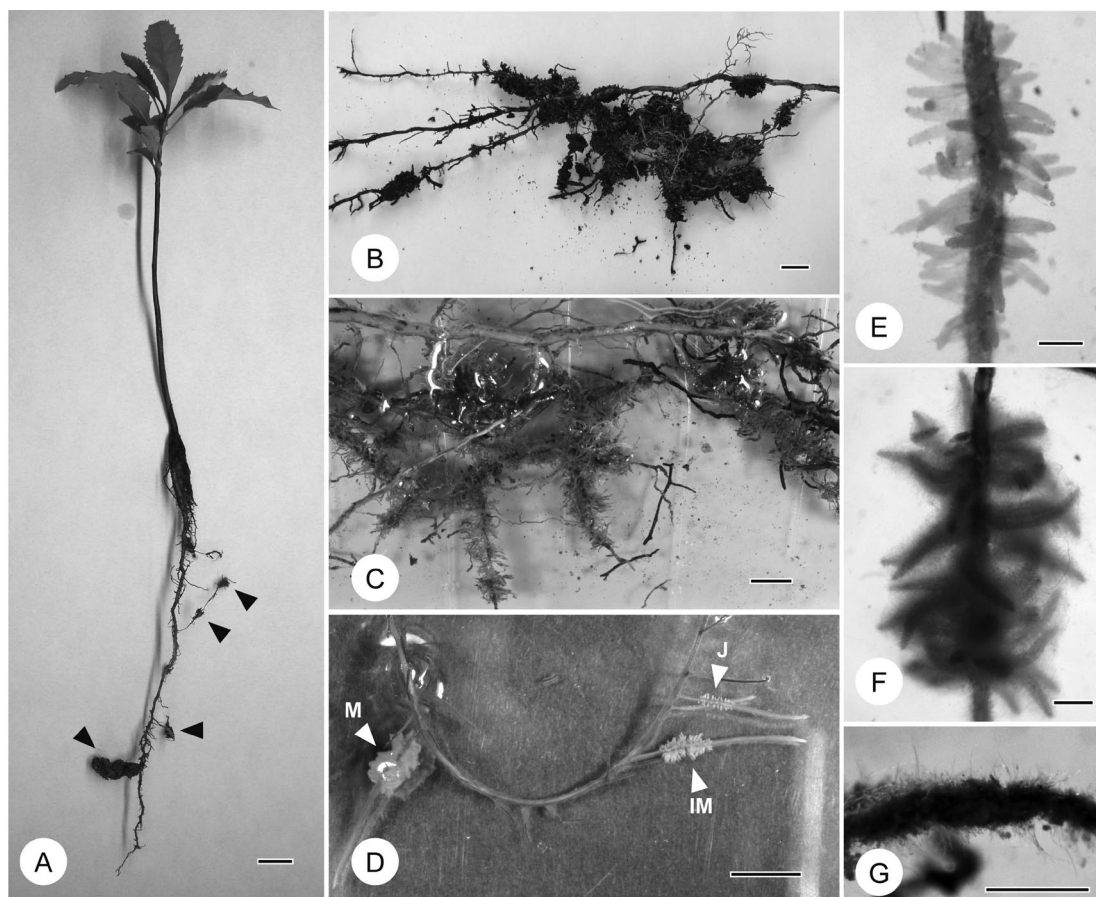


Fig. 1. Cluster roots of *Helicia cochinchinensis* Lour. A. Seedling dug from the soil. Arrow-heads indicate cluster root masses. B. Cluster roots found by digging soil in the vicinity of a mature tree of *H. cochinchinensis*. C. Cluster roots of B after washing with tap water. D. Cluster roots of hydroponically cultured seedling. Abbreviation of cluster roots. J. Juvenile stage. IM. Immature stage. M. Mature stage. E. Immature cluster roots of hydroponically cultured seedling. F. Mature cluster roots of hydroponically cultured seedling. G. A rootlet of the mature cluster root. The density of root hairs of the mature clusters is higher than that of the immature clusters. Bars indicate 1 cm (for A–D) and 1 mm (for E–G).

MES (pH 5.6) を反応用緩衝液とし、蛍光マイクロプレートリーダー (ALVO X1; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて 30 °C でインキュベートしたときに本酵素の反応により生じる分解産物 4-methylumbelliferone の蛍光を励起波長 360 nm, 測定波長 460 nm で測定し、その蛍光の増加速度から活性を算出した。

結果と考察

宮島自然植物実験所の敷地内に生育するヤマモガシの周辺土壌を掘り返したところ、典型的なクラスター根を発見した (Figs. 1A–C)。実生におい

ては、二次根から密に小根が生じて房状となっている根が、幅が約 0.5 cm, 長さが 0.5 から 1.0 cm 程度まで発達したものが見いだされ、これが土壌粒子を強く結合する様子が確認された (Fig. 1A)。これは *Hakea* などで見いだされている単純型 (Simple type) クラスター根 (Lambers et al. 2011) の典型的な形状と一致していることから、今回見出された根がクラスター根であることが確認された。また、実生がクラスター根をつけていることから、ヤマモガシのクラスター根であると同定することができた。また、成木のクラスター根は表層土から深さ 10 cm 以内の比較的浅い場所

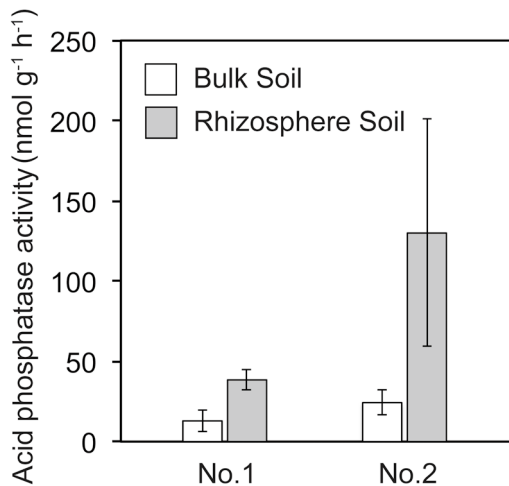


Fig. 2. Activity of acid phosphatase in bulk and rhizosphere soils growing *Helictia cochinchinensis*. Error bars indicate S.E.

から発見された (Fig. 1B, C). また、成木のクラスタ根は同実験所内で調査したヤマモガシ植栽木2個体の両方において発見された。発見したクラスタ根は土壌粒子と密に結合しており、黒い塊のようになっていた (Fig. 1B) が、根に付着した土を振るい落とし、よく水洗することによってクラスタ根であることを確認できた (Fig. 1D)。成木に見られたクラスタ根は、最も発達したもので幅が約 1 cm、小根を房状につけている長さは 2 cm 以上に達した。なお、成木から発見されたクラスタ根は個体間で形状に違いは見られず、ヤマモガシに由来するものと推定されたが、クラスタ根を発見した側根はどの木から伸びているのか判断できなかったため、DNA バーコーディングを行った。ヤマモガシ葉およびクラスタ根に由来する PCR 産物の塩基配列を比較した結果、その塩基配列 553 bp が完全に一致した (Accession No. LC002806) ことから、採取したクラスタ根はヤマモガシに由来するものであると結論付けられた。

ヤマモガシの実生をリン欠乏条件で約 5 か月間水耕栽培を行ったところ、クラスタ根を形成することも確認された (Fig. 1D–F)。この水耕栽培した実生においては、発達段階の異なるクラスタ根が観察された (Fig. 1D)。そこで、実体顕微鏡下で構造の観察を行ったところ、未成熟のクラスタ根においては根毛の発達が見ら

れず (Fig. 1E)、成熟したクラスタ根においては明瞭な根毛密度の増加が認められた (Fig. 1F–G)。一般に、クラスタ根はこれを形成する小根の先端付近には根毛の長さや密度が高まることが知られている (Lamont 2003, Shane and Lambers 2005, Watt and Evans 1999)。根毛密度の増加は表面積を増加させることから、リン吸収を高めることに繋がるものと判断される。また、発達段階の異なるクラスタ根は、その生理的機能にも強く影響することが示唆されている (Neumann and Martinoia 2002, Shane and Lambers 2005)。とくに、一過的に成熟クラスタ根において高まるリン可給化能は難溶性リンの吸収においては重要であると考えられ、ヤマモガシにおいても同様に成熟クラスタ根はリンの吸収に重要な役割を果たすものと考えられた。

そこで、成熟クラスタ根を多く含むクラスタ根の根圏土壌を採取し、根圏土壌におけるリン可給化能に関わる生理機能の調査を行った。Fig. 2 に、有機態リン可給化の指標となるホスファターゼ活性の測定結果を示した。2 個体あった植栽木の根元から採取した根圏土壌ではいずれも非根圏土壌と比較してその酵素活性は高かったが、個体間での活性の差も大きかった。ホスファターゼ活性は植物の保持するリンの栄養状態により影響を受けることが報告されている (Wasaki et al. 2003) ため、この違いは個体間の栄養状態の違いを反映しているものと考えられた。また、本実験で測定したホスファターゼ活性を、過去に調査されたクラスタ根周辺において局所的に回収した根圏土壌のホスファターゼ活性と比較した場合、ヤマモガシ科 *Banksia* の 3 種のクラスタ根と比較して十分の程度、マメ科のシロバナルーピン *Lupinus albus* のクラスタ根と比較して数分の程度とあまり高くない (Marschner et al. 2005, Wasaki et al. 2005)。ただし、これらの研究とは土壌の種類が異なるため重量あたりの活性で算出した場合の活性には土壌の質が影響すること、基質や反応条件が同一ではないことから、一概にヤマモガシのクラスタ根の根圏におけるホスファターゼの活性が低いと結論づけるべきではないだろう。本研究においてはクラスタ根のみからの根圏土壌を回収したのではないこと、本研究の結果 (Fig. 2) と同様にオーストラリアの *Banksia* の場合でも非根圏とクラスタ根の根圏の間に見ら

れるホスファターゼ活性の違いは数倍程度であること (Marschner et al. 2005) を合わせて考えると、他の植物が形成したクラスター根と同様に、ヤマモガシの形成したクラスター根においても酸性ホスファターゼの分泌が促進されているものと推定される。

また、有機酸分泌は難溶性リンの可給化をもたらす。根から分泌される有機酸の多くは、土壌微生物により比較的分解を受けやすい (Bürmann et al. 2005, Weiskopf et al. 2006) ことから、直接測定することは困難である。一般的には有機酸が分泌されるときには水素イオンとの共輸送が起こるため、シロバナルーピンやオーストラリアのヤマモガシ科 *Hakea sericea* のクラスター根では顕著な酸性化が起きることが知られている (Neumann and Martinoia 2002, Sousa et al. 2007, Tomasi et al. 2009, Yan et al. 2002)。したがって、土壌 pH の低下により有機酸分泌能の評価が可能であると考えられた。そこで、非根圏土壌とクラスター根の根圏土壌における pH を調査したところ、Tree 1 ではそれぞれ 5.27 ± 0.12 , 4.79 ± 0.06 であり、Tree 2 ではそれぞれ 5.40 ± 0.20 , 4.78 ± 0.02 であった。いずれの個体とも、pH はクラスター根の根圏で低下しており、クラスター根からの有機酸分泌の影響を受けているものと推定された。根圏の土壌 pH の低下はリン可給化に寄与する可能性が指摘されている (Neumann and Martinoia 2002, Weiskopf et al. 2006)。また、シロバナルーピンのクラスター根の根圏で重金属イオンが可溶化することにより吸収が増えることが知られている (Dinkelaker et al. 1989)。ヤマモガシ科植物でも同様に Mn の濃度が高いことが報告されている (Dinkelaker et al. 1995) ことから、ヤマモガシ科植物においてもクラスター根における有機酸の分泌と同時に pH の低下が起き、このことが少なくともリンの可給化に寄与するものと推察される。

以上のことから、本研究で初めて観察されたヤマモガシのクラスター根は、ほかのクラスター根を形成する植物種と同様に、根毛を増やす、リンを可給化する物質の分泌能を高めることによって難利用性リンからのリンの吸収を高めており、吸収可能なリンが少ない環境にヤマモガシが適応する上で重要な役割を果しているものと考えられた。

Voucher specimen: JAPAN. Honshu. Hiroshima Pref., Hatsukaichi-shi, Miyajima-cho, ca 10 m alt., 1 August 2009, S. Mukai s.n. (HIRO-MY 25753).

本原稿の英文を校閲していただいた、タスマニア博物館の R. D. Seppelt 博士に深謝いたします。また、本研究の一部は、科研費 MEXT/JSPS no. 23770089 および 23688010 の助成を受けたものである。

摘要

クラスター根はリン欠乏条件で一部の植物が形成する試験管ブラシ状の特殊な形状の根で、表面積の増加や難利用性リンを可給化する物質の分泌によりリン吸収能を高めている。ヤマモガシ科植物はクラスター根を作ることが知られている種を多く含むが、これまでにクラスター根の形成について報告があるのはオーストラリアと南アフリカに分布する *Banksia* 属や *Hakea* 属が中心であった。本研究では、日本に存在する唯一のヤマモガシ科植物であるヤマモガシ *Helicia cochinchinensis* Lour. の自生地から得られた種子を播種した植栽木とその周辺に自然に生じた実生を対象に調査を行い、本種もまたクラスター根を形成することを見いだした。また、本種の形成したクラスター根の根圏において、非根圏よりも土壌 pH が低く、酸性ホスファターゼ活性も高いことから、根圏土壌におけるリンの可給化にこのクラスター根が寄与していることが示唆された。

引用文献

- Briggs B. G. 1995. ヤマモガシ科 *Proteaceae*. 朝日百科, 植物の世界 **44**: 4-242-4-244.
- Briggs B. G., 堀田 満 1995. ヤマモガシ. 朝日百科, 植物の世界 **44**: 4-246-4-248.
- Bürmann H., Meier S., Bunge M., Widmer F. and Zeyer J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol.* **7**: 1711-1724.
- CBOL Plant Working Group 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS* **106**: 12794-12797.
- Dinkelaker B., Hengeler C. and Marschner H. 1995. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot. Acta* **108**: 183-200.
- Dinkelaker B., Römheld V. and Marschner H. 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant*

- Cell Environ. **12**: 285–292.
- 広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会(編) 1997. 広島県植物誌. 832 pp. 中国新聞社, 広島.
- Lambers H., Bishop J. G., Hopper S. D., Laliberté E. and Zúñiga-Feest A. 2012. Phosphorus- mobilization ecosystem engineering: the roles of cluster roots and carboxylate exudation in young P-limited ecosystems. *Ann. Bot.* **110**: 329–348.
- Lambers H., Finnegan P. M., Laliberté E., Pearse S. J., Ryan M. H., Shane M. W., and Veneklaas E. J. 2011. Phosphorus nutrition of *Proteaceae* in severely phosphorus-impooverished soils: Are there lessons to be learned for future crops? *Plant Physiol.* **156**: 1058–1066.
- Lamont B. 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters – a review. *Plant Soil.* **248**: 1–19.
- Marschner P., Grierson P. F. and Rengel Z. 2005. Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. *Appl. Soil Ecol.* **28**: 191–201.
- Maruyama H., Yamamura T., Kaneko Y., Matsui H., Watanabe T., Shinano T., Osaki M. and Wasaki J. 2012. Effect of exogenous phosphatase and phytase activities on organic phosphate mobilization in soils with different phosphate adsorption capacities. *Soil Sci. Plant Nutr.* **58**: 41–51.
- Morimura K., Gatayama A., Tsukimata R., Matsunami K., Otsuka H., Hirata E., Shinzato T., Aramoto M. and Takeda Y. 2006. 5-O-glucosylidihydroflavones from the leaves of *Helicia cochinchinensis*. *Phytochemistry* **67**: 2681–2685.
- Neumann G. and Martinoia E. 2002. Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* **7**: 162–167.
- 関 太郎, 中西弘樹, 鈴木兵二, 堀川芳雄 1975. 巖島(宮島)の維管束植物. 天然記念物瀨山原始林・特別名勝巖島緊急調査委員会(編), 巖島の自然, 総合学術調査報告, pp. 221–332 + pls. xvii–xviii. 宮島町.
- Shane M. W. and Lambers H. 2005. Cluster roots: A curiosity in context. *Plant Soil* **274**: 101–125.
- Skene K. R. 1998. Cluster roots: some ecological considerations. *J. Ecol.* **86**: 1060–1064.
- Sousa M. F., Façanha A. R., Taveres R. M., Lino-Neto T., and Gerós G. 2007. Phosphate transport by proteoid roots of *Hakea sericea*. *Plant Sci.* **173**: 550–558.
- 杉本順一 1984. 静岡県植物誌. 814 pp. 第一法規出版, 東京.
- Tomasi N., Kretzshmar T., Espen L., Weisskopf L., Fuglsang A. T., Palmgren M. G., Neumann G., Varanini Z., Pinton R., Martinoia E. and Cesco S. 2009. Plasma membrane H⁺-ATPase dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin. *Plant Cell Environ.* **32**: 465–475.
- 和崎 淳 2006. クラスタ根形成による植物の養分獲得機構. 一部の植物でみられる「クラスタ根」の形成は, 養分(特にリン)の獲得能力を高める適応戦略である. *化学と生物* **44**: 420–423.
- Wasaki J., Rothe A., Kania A., Neumann G., Römheld V., Shinano T., Osaki M. and Kandeler E. 2005. Root exudation, P acquisition and microbial diversity in the rhizosphere of *Lupinus albus* as affected by P supply and atmospheric CO₂ concentration. *J. Environ. Qual.* **34**: 2157–2166.
- Wasaki J., Yamamura T., Shinano T. and Osaki M. 2003. Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Soil* **248**: 129–136.
- Watt M. and Evans J. R. 1999. Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol.* **121**: 317–323.
- Weisskopf L., Abou-Mansour E., Fromin N., Tomasi N., Santelia D., Edelkott I., Neumann G., Aragno M., Tabacchi R. and Martinoia E. 2006. White lupin has developed a complex strategy to limit microbial degradation of secreted citrate required for phosphate acquisition. *Plant Cell Environ.* **29**: 919–927.
- 山本修平 2005. 紀伊半島におけるヤマモガシ(ヤマモガシ科)の分布. *南紀生物* **47**: 167–169.
- Yan F., Zhu Y., Müller C., Zörb C. and Schubert S. 2002. Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiol.* **129**: 50–63.