

令和元年6月10日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07281

研究課題名(和文) 潜在的なダイズ黒根腐病菌の感染による大豆の生育，大豆の根粒活性へ及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of red crown rot of soybean on growth and nodule activity of soybean

研究代表者

前川 富也 (MAEKAWA, Tomiya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・主任研究員

研究者番号：40409090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、原因不明の生育不良に黒根腐病が関わっている可能性を調査した。黒根腐病菌を接種したダイズは観察上健全株と変わらないにも関わらず、根粒窒素固定能(ARA)が著しく低下した。この現象は他の立枯性病菌ではみられず、黒根腐病菌に特有である可能性が示唆された。根分け法を使用した試験の結果、黒根腐病菌を接種した片側のポットのみARAの低下がみられ、ARAの停止が部分的におこっていることを示す結果となった。黒根腐病菌の接種量によってARAに及ぼす影響に差がある可能性が示唆された。また、接種病原菌をプレート培養物から、分生孢子・微小菌核へ変更してもARAの低下は確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、病気罹病株の窒素固定能を非破壊的かつ経時的に測定し、病気の経過(病気の進行の影響)を調査した事例として過去に例がない。その内容はダイズが観察上健全であっても、窒素固定能が停止し、生育停滞・収量低下が引き起こされていること、窒素固定能の停止は、接種源の濃度により変化することなどである。この情報は黒根腐病対策の検討に必要で、ダイズ生産性改善に大きく寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The theme of this study is to investigate the possibility that red crown rot (RCR) was related to unexplained growth inhibitions. Although soybean inoculated with the of RCR pathogen (*Calonectria llicicola*) is observationally unchanged from the control soybean, nodule nitrogen fixation ability (acetylene reduction activity, ARA) of inoculated soybean decreased remarkably. This decline of ARA was not observed in other pathogens (Charcoal Rot, Soybean Wilt Disease), suggesting that it might be unique to RCR. As a result of the experiment using the Root-split method, the decline of ARA was observed only in the pot on one side inoculated with RCR, which indicated that the suppression of ARA was partially occurred. It was suggested that the decline of ARA may differ depending on the inoculation amount of RCR. In addition, the decline of ARA was also confirmed in conidia and micro sclerotium of RCR.

研究分野：農学 作物学

キーワード：ダイズ 根粒 窒素固定能 黒根腐病 ストレス応答反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、日本のダイズ収量は約 165kg/10a と低迷し、北南米の顕著な増加 (約 300kg/10a) とは対照的な状況にある。特に、転換畑での栽培、栽培初期の湿害、乾燥による生育不良や莢障害、原因不明の生育不良 (草丈の伸長不足、早期黄化、早期枯熟) など日本特有の条件が収量阻害要因となっている ()。日本では、ダイズ生産の約 8 割を占める水田転換畑での栽培技術の改善が行われ、FOEAS などの技術により、転換畑での栽培化 (排水性の向上)、生産初期の湿害 (苗立ち不良)、生育期間中の乾燥ストレス等の改善が可能となってきた。加えて、播種直後の苗立ち不良 (湿害) の多くは、生物学的な病気に起因する苗立ち枯症 (ダイズ茎疫病等) に起因し、これらは殺菌剤で防除可能になってきている ()。

これらの対策により大豆生産技術の改良が図られつつあるが、いまだに生産現場では原因不明の生育不良が頻りに観察され、単収は向上していない。

ダイズ黒根腐病は水田転換畑のような多湿条件で多発する立枯性病害で、ダイズの開花期以降に顕在化する。黒根腐病による被害は主に早期枯熟による有効莢数の減少、および子実の小粒化が挙げられ、被害程度の大きくない個体においても有効莢数は半減し、子実も著しく小粒化する ()。しかし、発病しても目に見える病変は早期黄化および早期枯熟程度であり、他の立枯性病害 (例えばダイズ茎疫病や白絹病では発病すると枯死し、欠株になる) とは異なり、被害が大きい個体でない限り、病気で枯死することはないことが最大の特徴である。そのため、生産現場では黒根腐病の認知度が極めて低く、現状では登録農薬もほとんどなく、防除法 () も試験され始めたばかりである。また、研究分担者を含む複数のチームが、黒根腐病が現地圃場において多発していることを報告しており ()、現地圃場においては多くのダイズが黒根腐病菌に感染していることが示唆されている。

これらのことから、現地圃場での原因不明の生育不良に本病が関わっている可能性は非常に高い。加えて、根粒の着生程度と本病に対する発病程度に関連があるとの報告もあるため ()、両者の関連が示唆されている。

研究代表者らは、生育 40 日程度のダイズに黒根腐病菌を接種し、根粒窒素固定の推移を観察したところ、黒根腐病菌を接種したダイズが観察上健全株と変わりないにも関わらず、根粒窒素固定能が著しく低下することを発見した ()。このことは黒根腐病菌が根系に潜在的に感染しているダイズ個体では、根の障害、中でも根粒窒素固定能が著しく低下することにより、正常な生育ができずに収量が減少している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

そこで、本研究は現地圃場における原因不明の生育不良の一因が黒根腐菌の感染による窒素固定能の強制停止によるものであると仮説を設定し試験をおこなった。

- (1) 黒根腐病菌の接種による根粒窒素固定活性停止の確認。
- (2) 黒根腐病菌の接種と他の病原菌接種が根粒窒素固定活性に及ぼす影響の比較。
- (3) 根分け法を用いて黒根腐病菌による根粒窒素固定能の停止が全身的吗、部分的かの検証。
- (4) 異なる量の黒根腐病菌の接種が根粒窒素固定能に及ぼす影響。

3. 研究の方法

供試したダイズ品種はエンレイで、栽培は 1/5000 ポットにパーミキュライトとシリカサンドを 1:1 (容積比) で混合した土壌を培地として使用した。播種後根粒菌を培養した液体 (USDA110 10^8 /ml) を 1 粒当たり 1ml の割合で接種し、1 ポット当たり 1 個体とした。肥料は赤尾・河内の液肥で週 3 回、各回 100ml 施用した ()。人工光型グロースチャンパー内で生育させたのちに試験に供試した。設定温度は実験ごとに異なるが、おおよそ 25℃、日長は 16h、照度は 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF 以上に設定した。

根粒窒素固定活性は、非破壊で測定可能な通気型アセチレン還元活性測定法 (ARA) により測定した。ARA の測定はポットの上部をプラスチックの蓋で塞ぎ、ビニールテープで密閉した。植物体は蓋の中央の穴から出しシリコン栓とパテで密封した。ポットの排水溝をミックスガス (C_2H_2 , O_2 , N_2) の入り口として利用し、上部の蓋に出口の穴を設けチューブを接続し、その中のガスをシリンジでサンプリングした。ポットへ流入する流量は、2 L min^{-1} 、測定時の周囲温度は 26-28℃ に設定した。サンプリングしたガスは、ガスクロで測定し、エチレンの発生量 ($\mu\text{mol l}^{-1}$) を測定した ()。

黒根腐病菌 (*Calonectria illicicola*) のダイズへの接種方法は、PDA 培地 (Difco) (直径 9cm プレート) に 2 週間培養した黒根腐菌菌体 1 枚分を、10ml の滅菌蒸留水とともに摩砕し、それぞれの試験での接種時期に株元注入接種し発病を促した。この手法は炭腐病菌 (*Macrophomina phaseolina*)、立枯病菌 (*Fusarium oxysporum*) でも同様に用いた。

(1) ダイズに黒根腐病菌の接種源を接種し、その後おおよそ 1 週間おきに ARA を測定した。黒根腐病接種源は、播種後 34-43 日の間にダイズに接種した。処理は、黒根腐病菌接種源を接種

した接種区と比較対照区として何も接種していない Control 区を設けた。

(2) ダイズに各病原菌の接種源を接種し、その後おおよそ1週間おきに ARA を測定した。各接種源は、黒根腐病菌、炭腐病菌、立枯病菌を用いた。播種後 37-49 日の間にダイズに接種した。各病原菌接種源を接種した接種区と比較対照区として何も接種していない Control 区を設けた。

(3) 綿密な共生関係を構築し窒素固定を行っている「根粒菌-ダイズ」の共生に黒根腐病菌が介入してきた場合の共生関係への影響を調査した。水ストレスによる根粒窒素固定停止が全身的吗？部分的か？を検討した報告()を参考に、根分け法を用いて黒根腐病菌による根粒窒素固定の停止が全身的にコントロールされているかを調査した。この場合、「黒根腐病による根粒窒素固定の停止が部分的にコントロールされている場合は、黒根腐病菌接種のポットのみで根粒窒素固定の停止が起こり、全身的にコントロールされている場合は、黒根腐病菌が接種されていないもう片側のポットも根粒窒素固定活性の停止がおこる可能性」を検証した。

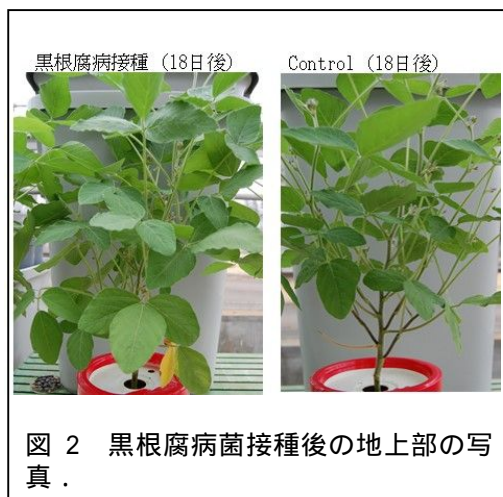
前段と同じ条件で栽培し、密閉できる根わけポットでダイズを根分け法で栽培した。播種後 60 日前後に片方のポットに黒根腐病菌を接種し、「C-C' 区」の対照区と「黒-C 区」の処理区の2区を設定した。接種後、適時 ARA の測定を行い、接種、対照を問わず両方のポットを測定した。

(4) ダイズに黒根腐病菌の接種源を接種し、その後おおよそ1週間おきに ARA を測定した。黒根腐病接種源は、播種後 42-45 日の間にダイズに接種した。処理は、接種菌量を3段階に変えた接種区と比較対照区として何も接種しない Control 区を設けた。一方、接種源による影響も調査するため、菌体の他、分生孢子及び、微小菌核を接種源として使用して試験をおこなった。

4. 研究成果

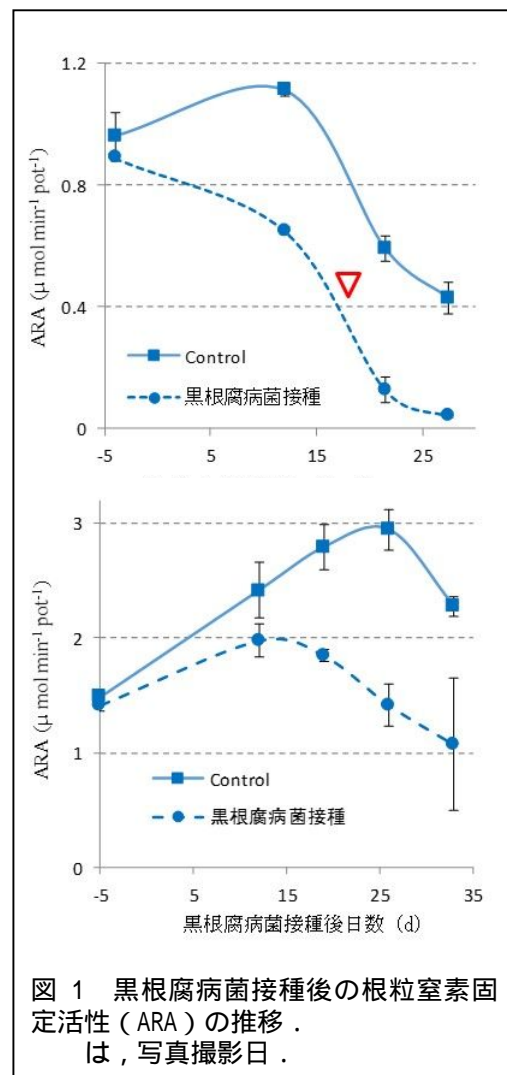
(1) 2 回試験を行ったが、どちらの試験においても、黒根腐病菌接種区で根粒窒素固定活性 (ARA) が著しく低下することが確認できた(図1)。黒根腐病菌接種 18 日後の地上部の写真より観察上健全株と変わらないにも関わらず、ARA が既に低下していることがわかった(図2)。

以上のことから、黒根腐病菌を接種したダイズは、観察上健全株と変わらないにも関わらず、根粒窒素固定活性が低下することがわかった。



(2) 黒根腐病菌とその他の異なる2種類(炭腐病菌、立枯病菌)を接種した試験を2回おこなった。どちらの試験においても、黒根腐病菌を接種した区のみ、接種後 25 日、10 日程度ごろに ARA の低下がみられた。他の2種類の病原菌では低下がみられず、Control 区と似たような反応を示す結果となった(図3)。

また、乾物重では黒根腐病と Control 区の違いがみられなかったが、根粒重では有意に差がみ



られた。他の病原菌との間にも同じ傾向があった（表1）。

以上のことから、黒根腐病菌による根粒窒素固定の低下は、黒根腐病に特異的にみられる現象で、供試した他の立枯性病害ではみられなかった。黒根腐病菌の接種で根粒の乾物重が低下していた。

表 1 黒根腐病菌とその他の立枯性病菌接種後の乾物重の推移。

		Shoot DW. (g pot ⁻¹)	Nodule DW. (g pot ⁻¹)
Ex.II-I	Control	39.0 a	1.07
	黒根腐病	31.4 ab	0.70
	炭腐病	19.8 b	0.98
	立枯病	30.5 ab	1.04

Ex.II-II	Control	72.1	1.57 a
	黒根腐病	64.1	0.83 b
	炭腐病	67.2	1.62 a
	立枯病	70.7	1.60 a

サンプル日：播種後 72 日（Exp. II-I），
播種後 80 日（Exp. II-II）

注）処理区内の異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差があることを示す。

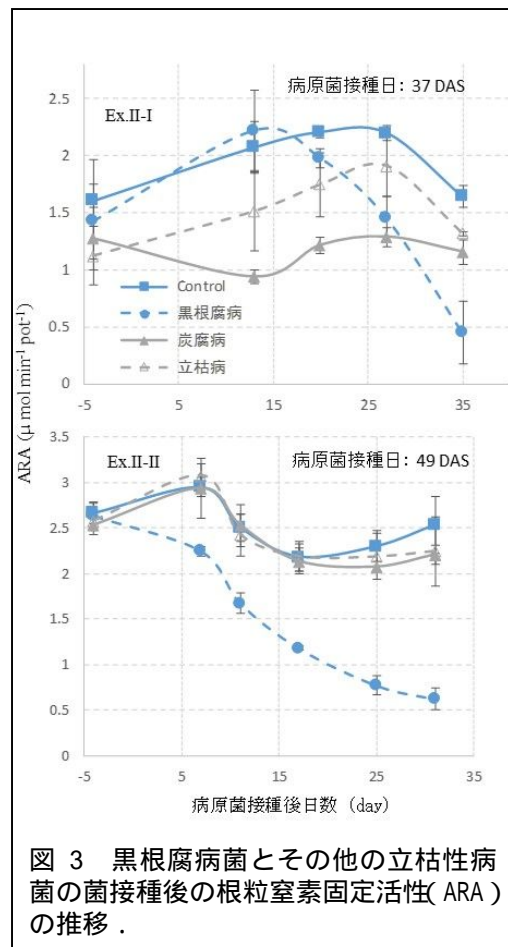


図 3 黒根腐病菌とその他の立枯性病菌の菌接種後の根粒窒素固定活性 (ARA) の推移。

(3) 片方に黒根腐病菌を接種する「黒-C区」の処理区と対照区の「C-C'区」を用いた（図4，表2）。

片方に黒根腐病菌を接種する「黒-C区」では、接種区画のみで ARA が低下し、接種後 15-30 日辺りで減少した。それに対して、接種しない「C-C'区」では、ARA の低下はみられなかった（図5）。

根粒の乾物重当たりの根粒窒素固定活性（ARA， $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}(\text{nodule DW})^{-1}$ ）は、「黒-C」区の黒区以外では大きな差はなく、黒区では著しい低下がみられた。（図6）。この低下は、「黒-C」区の黒根腐病菌接種ポットでサンプリングされた根粒重が低いことによるものだと考えられる（データ省略）。

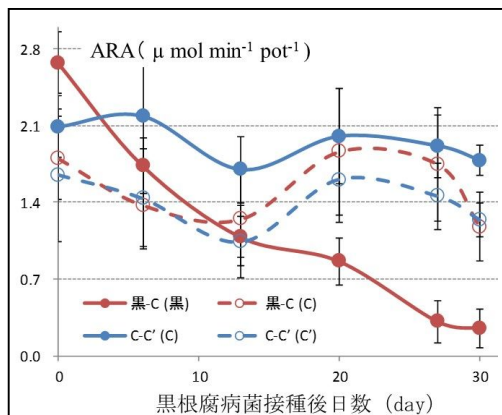


図 5 黒根腐病菌接種後の各処理区（区画）の根粒窒素固定活性（ARA）の推移。

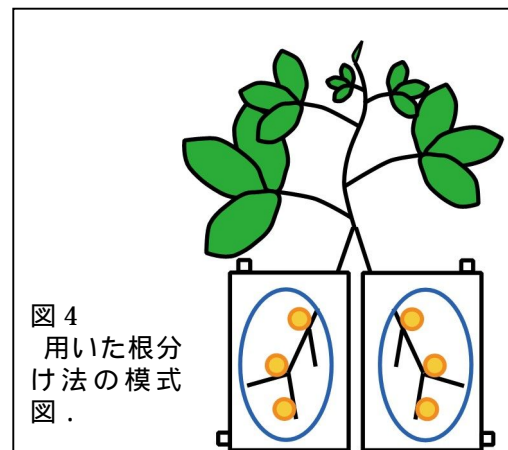


図 4 用いた根分け法の模式図。

表 2 根分け法の処理区の概要。

処理	ポット位置	右	左
	黒-C	黒	C
C-C'	C	C'	

注）C-C'区：対照-対照区
黒-C区：黒根腐病菌接種-対照区

以上のことより、黒根腐病菌を接種した場所のみに窒素固定能の減少がみられた。黒根腐病による窒素固定能低下は、根の局所的な場所で起きていることが考えられた。

(4) 黒根腐病菌の接種量を段階的に設定して実験をおこなった。また、他の接種源による違いを調査するために、接種源を複数試みた。

9cm プレート培養物 1 枚分を接種源の基準とした接種源の場合、明確な差がみられず、すべての菌量接種区で ARA が低下した (図 7 上段)。

分生孢子が接種源の場合、接種する量によって ARA が低下する場合と低下しない場合があった (図 7 下段)。

また、微小菌核が接種源の場合、分生孢子数と同様の結果となった (未発表, データ省略)。

以上のことから、接種する黒根腐病菌の量によって根粒窒素固定活性に及ぼす影響に差がある可能性が示唆された。また、接種病原菌を培養物(菌体)から、分生孢子・微小菌核へ変更しても黒根腐病菌の根粒窒素固定活性への低下は確認できた。

<引用文献>

国分牧衛 他. 2003. わが国における食用マメ類の研究, 中央農総研. p281-317.

加藤雅康. 2011. 微生物によるダイズの出芽不良とその対策 農林水産技術研究ジャーナル 34 (8): 47-50.

西和文 他. 1999. ダイズ黒根腐病の発生生態と防除, 農研センター研報 30: 11-109.

荒井義光 他. 2010. 福島県における大豆黒根腐病の発生状況と被害程度, 日本作物学会東北支部会報 53: 47-48.

越智直 他. 2013. 晩播と冬期湛水の組み合わせによるダイズ黒根腐病の抑制効果の検証, 北日本病害虫研究会報 64: 46-51.

黒田智久 他. 2010. ダイズ黒根腐病の根の発病経過と新潟県における発生実態, 日植病報 76(3): 207.

Tazawa J. et al. 2007. Nodulation during vegetative growth of soybean stage does not affect the susceptibility to red crown rot caused by *Calonectria ilicicola*. J Gen. Plant Pathol. 73: 180-184.

前川富也 他. 2014. 黒根腐病菌接種がダイズの根粒活性に及ぼす影響. 日作紀 83 (別 1): 382-383.

Akao, S. and Kouchi, H. 1989. Light microscopic observation of root hair curling of soybean induced by *rhizobium* infection. *Soil Sci. Plant Nutr.* 60: 53-55.

Maekawa, T. et al. 2011. Effects of short-term waterlogging on soybean nodule nitrogen fixation at different soil reductions and temperatures. *Plant Produc. Sci.* 14: 349-358.

Daniel Marino et al. 2007. Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiol.* 143: 1968-1974.

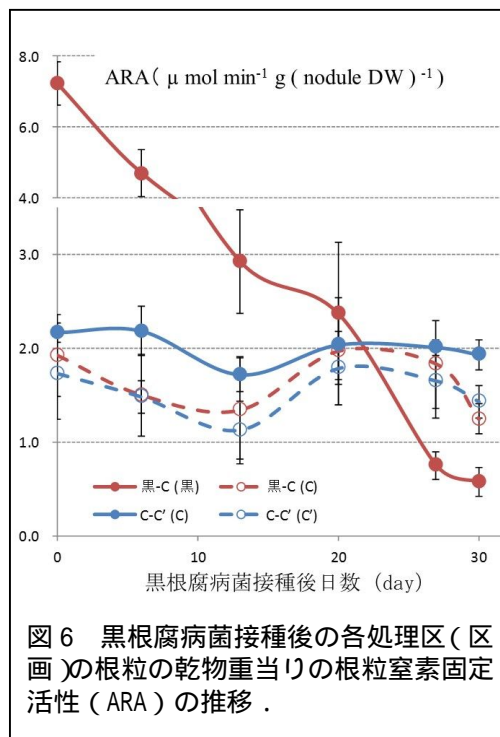


図 6 黒根腐病菌接種後の各処理区(区画)の根粒の乾物重当りの根粒窒素固定活性 (ARA) の推移。

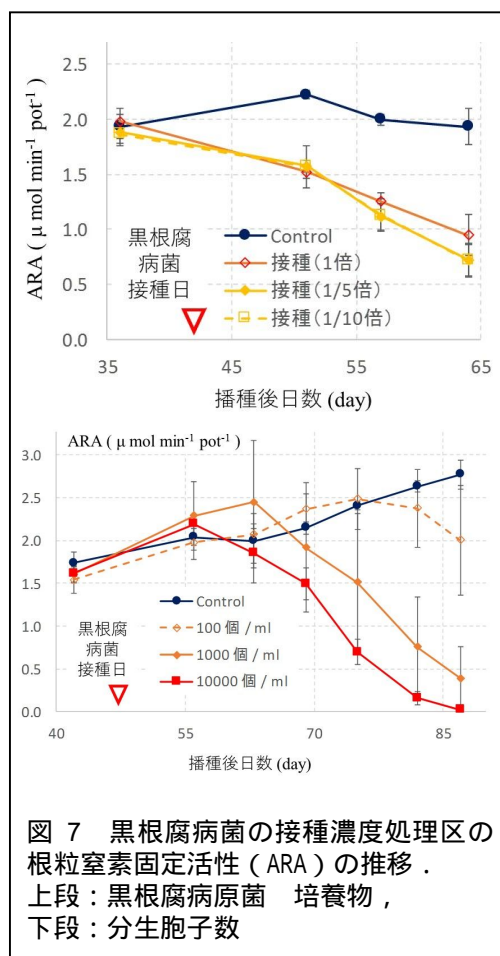


図 7 黒根腐病菌の接種濃度処理区の根粒窒素固定活性 (ARA) の推移。
上段: 黒根腐病原菌 培養物,
下段: 分生孢子数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

前川 富也 ミニシンポジウム 2 微生物とダイズ生産，生産現場の環境条件．日本作物学会記事(2015)，第 84 巻，316-317．(査読無)

〔学会発表〕(計 4 件)

前川 富也，越智 直，新良 力也．黒根腐病による根粒窒素固定の停止 - 接種濃度の影響 - ．日本作物学会第 245 回講演会．2018 年．

前川 富也．黒根腐病と根粒窒素固定．第 2 回ダイズ黒根腐病研究会．2016 年．

前川 富也，越智 直，島田 信二，新良 力也．黒根腐病による根粒窒素固定の停止 - 過湿ストレスの影響 - ．日本作物学会第 242 回講演会．2016 年．

前川 富也，越智 直，島田 信二，新良 力也．黒根腐病による根粒窒素固定の停止 - 他の病原菌とダイズの開花特性 - ．日本作物学会第 241 回講演会．2016 年．

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 越智 直

ローマ字氏名： OCHI, Sunao

所属研究機関名： 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名： 中央農業研究センター

職名： 主任研究員

研究者番号(8桁)： 9 0 4 1 4 6 1 4

(削除：平成 28 年度)

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。