

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07623

研究課題名(和文)炭化物への根から滲出する物質の吸着が土壌微生物の変異に及ぼす作物生産向上の解明

研究課題名(英文)Elucidation of crop production improvement on changes of soil microorganisms by adsorption of substances exuding from roots to biochar

研究代表者

西原 英治(NISHIHARA, Eiji)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：40452544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：活性炭(AC)は、根の滲出液を吸着する吸着剤であるが、作物収量、微生物、温室効果ガスに影響を及ぼす可能性がある。そこで2年間のポット実験を行った。供試ダイズ系統は、異なる根粒形成能のTnVRSN4、タチナガハ及びTnVRNN4とし、AC量は0、2.4、4.8及び9.6 t_{ha}⁻¹とした。この結果、AC施用は根粒形成を大幅に減少させ、TnVRSN4土壌からのN₂O排出を減少させた。ACはTnVRSN4の収量に影響を及ぼさなかったが、TnVRNN4とタチナガハの収量は減少させた。ACは根のイソフラボンに影響を及ぼさなかったが、土壌中のダイゼイン及びダイジン濃度を有意に減少させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、連作障害を回避させる資材である活性炭施用によってマメ科ダイズの子実収量、マメ科に着生する根粒菌、そして化学肥料と収穫後の根粒菌の腐敗から発生する温室効果ガス的一种であるN₂Oの発生の影響を調査した。一般にダイズのようなマメ科作物は根粒菌の着生のため、窒素肥料の施用量は少ないとされている。しかし、本研究によって、AC施用は、ダイズから滲出する根粒菌着生の誘導物質を吸着させ根粒菌の着生量が減少させながら、子実収量を維持させることを証明した。さらにAC施用によって根粒菌着生数が減少し、収穫後の根粒菌の腐敗から発生するN₂Oもほぼなくなる環境にやさしい栽培になることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Activated carbon (AC) is a known adsorbent for organic compounds including root exudates but could have an influence on crop yield, microorganisms and greenhouse gas (GHG) emissions. A 2-year pot experiment was conducted to assess the effect of AC on GHG emissions, seed yield, root exudates, and nodulation after harvest. The soybean genotypes used were TnVRSN4, Tachinagaha and TnVRNN4 with very high, normal and very low nodulation capacities respectively under different rates of AC (0, 2.4, 4.8 and 9.6 t_{ha}⁻¹) with inorganic fertilizer. The results showed that AC tended to reduce N₂O emissions in TnVRSN4 soils in both years due to the significant reduction in nodulation. AC did not significantly affect seed yield of TnVRSN4 but significantly reduced seed yield of TnVRNN4 and Tachinagaha in 2017 and 2018 respectively. Root isoflavone were not significantly affected by AC but significantly reduced the concentration of daidzein and daidzin in soil.

研究分野：栽培学

キーワード：アレロケミカル 炭化物(活性炭) 物質吸着 根粒菌 温室効果ガス(N₂O)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

応募者は、アレロパシーが関与する連作障害回避に向けた活性炭等の炭化物の施用効果についてもダイズ、ソラマメ、アスパラガス、ウメなどの幅広い作物で確認してきている。このように炭化物の種類によって物質の吸着能力に強弱があるものの、炭化物は根から滲出するアレロパシー物質を含む物質を吸着し作物の連作障害から回避させる資材であることが推測できる。その一方で、土壤微生物相の脆弱性は、例えばダイズの根からの滲出物であるイソフラボンのゲニステインやダイゼインのようなシグナル物質が炭化物の物質吸着によって起こり、通常着生し共生できる根粒菌等が共生できなくなっている可能性も考えられるが、応募者の研究の結果から連作におけるダイズの収量は活性炭施用により単作の収量と同様かそれ以上収量を維持できている(元木ら、2012)。このことから、活性炭のような炭化物施用におけるダイズの収量と根粒菌着生率の関係に矛盾が生じ、ダイズの収量には根粒菌の着生が重要なのか疑問が生じる。しかし、もし炭化物施用によってダイズに共生する根粒菌着生率が低下すれば、ダイズ収穫後のダイズ残渣および根に着生している老化根粒菌から放出される全体の N₂O 放出量も連作障害回避と同時に軽減できる可能性もある。炭化物は有効な農業資材の一つであると考えられるが、依然不明な点が多く存在し、炭化物の物質吸着特性の持続効果も長期的に解明していく必要がある。そこで、上記の一連の矛盾を整理するために、本研究では異なる根粒菌着生を有しているダイズ系統を用い、炭化物施用における各系統への根粒菌の着生度合いを根から滲出するシグナル物質の定量および炭化物への吸着で明らかにし、炭化物施用による根粒菌着生や成育促進効果を単作および連作といった一連の栽培体系から解明する。同時に、窒素肥料や老化根粒菌含む作物残渣から放出される N₂O の吸着低減効果も評価した。

2. 研究の目的

本研究はマメ科作物ダイズを用いて2年間連作を行い、下記の3つの解明を行った。

(1) 炭化物によるアレロパシー物質や N₂O のような物質の物理化学的吸着と特性土壤微生物(根粒菌)に与える影響を解明した。

(2) 炭化物が土壌中のアレロパシー物質を吸着させ、植物体の生育を改善させる効果はあるもの、地上部の生育改善効果と土壤微生物の動態の関係を明らかにした。

(3) ダイズ子実収穫後の根に着生していた根粒菌の腐敗と伴に発生する N₂O 量の把握と木質系活性炭施用による N₂O 吸着の有無を確認した。

3. 研究の方法

(1) ポット試験

本実験は、2017年、2018年および2019年の6月から10月までの3年間ポット連作栽培試験を行った。ポットは1/2000aワグネルポットを用い(高さ29.3cm、外径25.6cm、内径24.0cm)供試土壌は砂丘未熟土とした。実験の前に、土壌を風乾し、2mmのふるいに通して雑草やその他の破片を取り除いた。木質系活性炭(AC)は粉末状で(味の素ファインテクノ(株))から購入した。ACは、2017年に1回、0、2.4、4.8、および9.6 t ha⁻¹(ポットあたり0、12、24、および48g)に相当する量を砂丘未熟土と混和したそれぞれCTR、AC1、AC2およびAC3区の計4区を設けた。施肥は、毎年作付け前にダイズのhaあたりN:P:Kが45kg、150kg、150kgとした。また苦土石灰は500 kg ha⁻¹とした。肥料とACは深さ10cmでよく混合した。

供試ダイズ系統は、異なる根粒着生能力を有している3種; TnVRSN4、Tachinagaha および TnVRNN4とし、根粒形成能力は、それぞれ高、中および低であった。反復は12とした。

2017年は、6月30日にTnVRSN4とTnVRNN4、タチナガハは2017年7月7日に育苗を開始した。TnVRSN4とTnVRNN4、そしてタチナガハはそれぞれ同年7月12日および7月19日に各区のポットに定植した。2年目の2018年は、6月29日に3系統の育苗を開始し、7月11日に2017年と同じポットにそれぞれ定植した。2019年は6月28日に播種し、7月10日にそれぞれポットへ連作として定植した。収穫はTnVRNN4、タチナガハ、TnVRSN4それぞれ2017年10月6日、12日、28日で、2018年は10月4日、10日、26日であった。なお2019年は9月3日に各処理区のポットからダイズを掘り取り、各区のダイズの着生している根粒菌を回収し、根粒菌の調査および根粒菌を用いたインキュベーション試験の準備を行った。インキュベーションには根粒の着生が確認されたTnVRSN4とタチナガハの2系統で行った。

各ポットの土壌水分は幼苗定植前に60%にした。その後は、毎日の気温・地温とダイズの成長段階に応じて、200~300mlの水を各ポットに1日1回または2回行った。この灌水量は、各ポットの下から水が出ない量であった。土壌水分のモニタリングはTDRを使用し深さ12cm測定し、WFPSとした(Basalirwa et al., 2019)。地温は深さ5cmに設置し、栽培期間中測定した。

(2) ガスサンプリングと分析

各区のポットから放出されるガスの回収は、2017年7月14日から9月27日まで、2018年7月12日から9月28日まで行い、各サンプリングは午前6時から午前10時までに行った。ガスチャンパーは1/2000aワグネルポットに接続できる大きさ(外半径R13.5cm、内半径r11.9cm、高さ26cm)を定植後の最初の2週間用いた。チャンパーの上部には穴が3つあり、それぞれの穴は1つがサンプリング用、もう1つがチャンパー内の空気温度を測定するため、もう1つが圧力差を補正するためのエアバッファバッグが取り付けられるためのものであった。ダイズの成

長の増加により、PVCパイプを 1/2000a ワグネルポットに接続させながら高さを維持させた。最終的にチャンバーの高さは(定植後 3 週間目から)66 cm に達した。回収した空気の N₂O 濃度は、ECD ガスクロマトグラフ (GC-14B 島津) を使用して分析し、CO₂ および CH₄ 濃度は、それぞれ TCD と FID ガスクロマトグラフ (GC-8A および GC-14A、島津) で分析した。ガスフラックスは、40 分の閉鎖におけるチャンバーヘッドスペース内のガス濃度の直線的な増加を考慮して計算した。

(3) 土壌に化学性

各区から土壌を採取し、土壌 pH と EC、C/N 含量、土壌無機 N (交換可能な NH₄⁺-N および NO₃⁻-N)、pH、EC、合計 N、C / N 比、利用可能な P、交換可能な K、Ca および Mg を分析した。

(4) 生育と収量調査

収穫時に、鞘は乾燥した地十部から取り除き、草丈、茎径、枝数、鞘数を測定した。株および鞘あたりの種子数、株あたりの種子重量、種子あたりの平均重量を調査した。100 粒重量を推定しました。また、根を徹底的に洗浄し、根粒を根から除去し、後で根粒数を計測し、株あたりの着生した根粒の新鮮重と乾物重を測定した。根を風乾し、風乾後で微粉末にし、イソフラボン分析に使用した。

収穫して植物の根を取り除いた後、土壌を採取し、2 mm のふるいを通して目に見える根の粒子を取り除き、イソフラボンの分析まで -80 °C でビニール袋に保管しました。種子は細かい粉末に粉碎し、タンパク質とイソフラボンを分析した。タンパク質含有量は、種子の合計 N (%) に 5.51 を掛けることで算出した (Fujihara et al., 2010)。種子の合計 N は、前述の C / N コーダーの値を使った。また、種子、根および土壌のイソフラボン分析も HPLC で行った。イソフラボンは 6 種類; ダイゼイン、ダイジン、ゲニスチン、グリシチン、グリシテインおよびゲニステインとした。種子中の総イソフラボン含有量は、6 つの個々のイソフラボンについて得られた値を合計することによって得られました。

(5) 根粒菌によるインキュベーション試験

TnVRSN4 とタチナガハの 2 系統を栽培していた土壌を 3 ポットずつ採取し、風乾後、各区の 3 ポットを混合し、インキュベーション実験で使用するためにサブサンプル (約 500 g の風乾した土壌) を採取しました。土壌分析を行った。インキュベーション実験の開始前に、2 系統 (TnVRSN4 およびタチナガハ) のそれぞれの土壌 150 g の風乾土壌を 200 ml ガラス瓶に添加した。また木質系活性炭; 0、2.4、4.8、および 9.6 t ha⁻¹ に相当する割合の AC を各土壌に加え、よく混和した。各区は、2017 年に設置した処理区名と同等でそれぞれ CTR、AC1、AC2、および AC3 とした。各系統の根に着生していた新鮮な根粒 (> 2 mm) を 3 g それぞれのガラス瓶に追加し、再度よく混合した。土壌含水率は 60%WFPS とし、ガラス瓶を 3 か月間 (2019 年 9 月 13 日から 2019 年 12 月 13 日まで)、人工気象器 (MLR-352H、パナソニックヘルスケア (株)) で培養した。水分の蒸発を最小限に抑えるために穴が開いた蓋で覆われ、3 日おきに散水した。また通気のためにも開放することにより、土壌水分含量を 60%WFPS に維持した。人工気象器内の日中の温度および湿度はそれぞれ 30、65% とし、夜間はそれぞれ 25 °C、70% で実験を行った。

ガスサンプリングは実験開始後 1、2、3、4、5、6、7、10、13、18、25、33、42、53、63、74、83 および 92 日目に行った。

4. 研究成果

N₂O フラックスは処理間で有意に変化せず、すべてのダイズ系統 (遺伝子型) で同様のパターンになったが、これらのパターンは各年の作付けで異なっていました (図 1)。異なる活性炭施用量における各 3 系統から放出される N₂O には有意な差が認められなかったが、活性炭の施用量が多くなると N₂O 放出量は低下する傾向が認められた (表 1)。遺伝子型と AC 処理は N₂O 排出に大きな影響を与えませんでした。ただし、高根粒遺伝子型の土壌からの N₂O 排出量は、特に 2 つの作付けシーズン中にこの遺伝子型の N₂O 排出量を減らす傾向があった AC がない場合、他の遺伝子型よりも一般的に高かった。

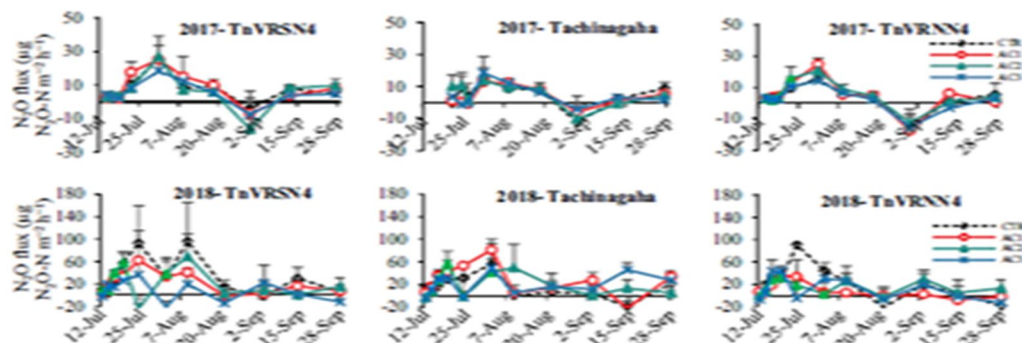


図 1 2017 年・2018 年の各ダイズ系統および異なる活性炭施用量における N₂O 放出量の経時的変化

表1 ダイズ3系統の2年間連作栽培における積算 N₂O、CO₂ および CH₄ 量に対する活性炭の影響

Year of cropping (Y)	Soybean Genotype (G)	Treatment (T)	N ₂ O emissions (kg N ha ⁻¹)	CO ₂ emissions (t C ha ⁻¹)	CH ₄ emissions (kg C ha ⁻¹)	
2017	TnVRSN4	CTR	0.14a	3.77a	0.08a	
		AC1	0.15a	3.44a	0.04a	
		AC2	0.10a	2.94a	0.19a	
	Tachinagaha	CTR	0.06a	1.70ab	0.05a	
		AC1	0.07a	1.22b	0.08a	
		AC2	0.06a	1.85ab	0.04a	
	TnVRNN4	CTR	0.08a	2.22a	0.09a	
		AC1	0.04a	1.26a	0.40a	
		AC2	0.07a	1.46a	0.38a	
	2018	TnVRSN4	CTR	0.08a	3.24a	0.20a
			AC1	0.02a	1.31a	0.03b
			AC2	0.02a	1.31a	0.03b
Tachinagaha		CTR	0.65a	7.43a	0.16a	
		AC1	0.39a	7.85a	-0.02a	
		AC2	0.35a	6.62a	0.34a	
TnVRNN4		CTR	0.12a	5.66a	0.07a	
		AC1	0.21a	5.32a	-0.04a	
		AC2	0.44a	4.99a	0.15a	
ANOVA P values		Y	***	***	NS	
		G	NS	***	NS	
		T	NS	NS	NS	
	Y x G	NS	**	NS		
	Y x T	NS	NS	NS		
	G x T	NS	NS	NS		
	Y x G x T	NS	NS	NS		

さらに、2017年のN₂Oフラックスは-16.3から27.0、-12.4から18.6および-17.6から24.9 μg N₂O-N m⁻² h⁻¹の範囲だったが、2018年には、フラックスが-23.3から96.1、-22.1から80.9の範囲であった。2018年の累積N₂O排出量は、2017年よりも大幅に多かった(表1)。

ACは高根粒着生系統であるTn-VRSN4の根粒数と新鮮重量を減らしたが、その影響は2018年にさらに顕著になった。一方、タチナガハでは、ACによって2017年に根粒数と新鮮重量を大幅に増加させたが、2018年はほとんど有意な差が認められなかった。さらに、低着生系統であるTnVRNN4は、1年目の2017年がほとんど根粒の着生を確認できなかったが、2018年の2連作目になると他の系統に比べ根粒の着生数は低いものの着生し、AC施用によってこの着生が阻害されていることが観察できた。

両年の作付において、ACはすべてのダイズ系統の根のイソフラボンに大きな影響を与えず、2018年に根で検出されたイソフラボンの数と含有量は2017年よりも一般的に高かった(省略)。

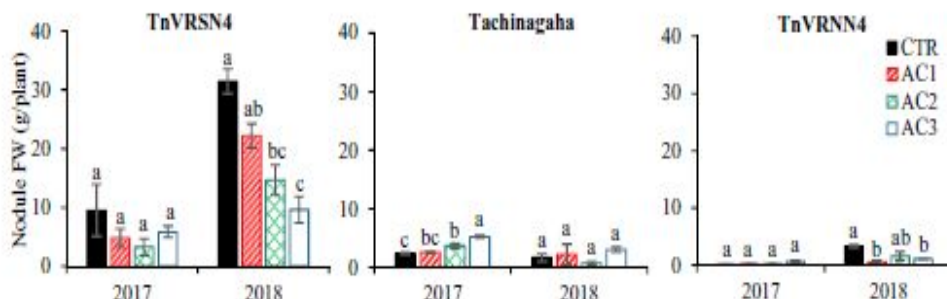


図2 ダイズ3系統の2年間連作栽培における根粒菌着生に及ぼす活性炭の影響

土壌のイソフラボンは、作付け年、系統、AC処理によって変化し、全体的にAC混和によって少なくなっていた(図3)。ダイジンとダイゼインは、ダイズ系統の土壌で最も多いイソフラボンであり、ACは、特にこれら2種のダイジンとダイゼインを吸着する可能性を示しました。ただし、グリシチンとグリシチン酸を吸着するACの可能性は一般に低かった。2017年には、すべてのダイズ系統でゲニスチン、グリシチンおよびゲニスチン酸は検出されなかったが、2018年には、ダイズ、ゲニスチン、およびゲニスチン酸は、タチナガハの栽培土壌では検出されなかった。

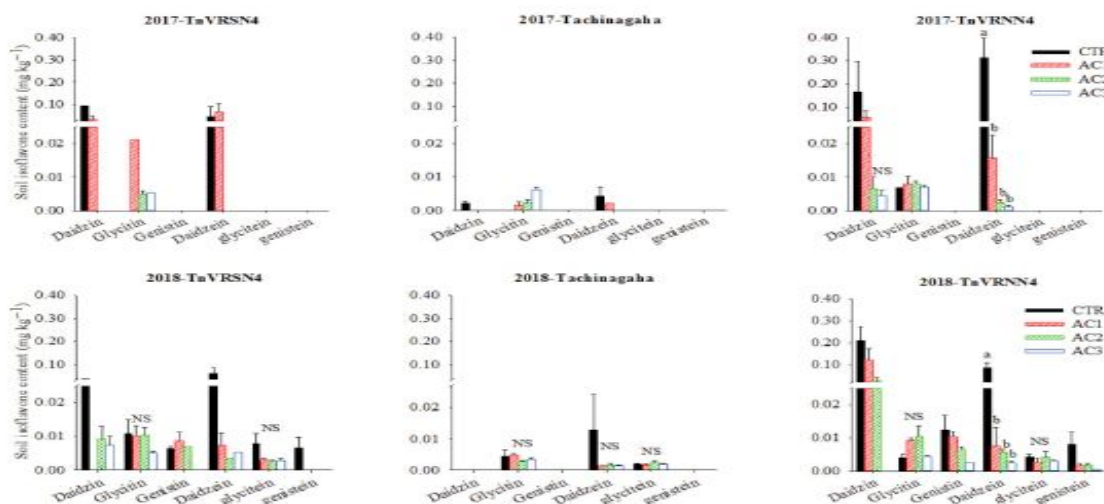


図3 ダイズ3系統の2年間連作栽培における根粒菌着生に関する誘導物質の及ぼす活性炭の影響

AC処理による各3系統の生育および収量はほとんど影響を示さなかった。子実収量が最も多

かったのは、根粒菌着生が高い Tn-VRSN4 であり、次いでタチナガハ、Tn-VRNN4 の順であった。AC によるダイズ系統の影響は、根粒菌の着生数以外なく、AC の施用量が多くなっても草丈、莖径、子実収量、枝数、100 粒重、種子重に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

一方、AC もよる Tn-VRSN4 とタチナガハに着生した根粒菌腐敗による N₂O 放出低減効果は、Tn-VRSN4 のみ認められた (図 4)。タチナガハは AC を施用していない対照区の方が AC に比べ若干高いものの、その差は少なかった。インキュベーション試験では、根粒を添加しない各系統を栽培していた土壌のみも N₂O 放出をモニタリングしており、土壌からの N₂O の放出量は微量であり、ダイズの収穫後の根粒の腐敗の過程での N₂O 量は約 5mgN kg⁻¹ 程度であることが明らかとなった。

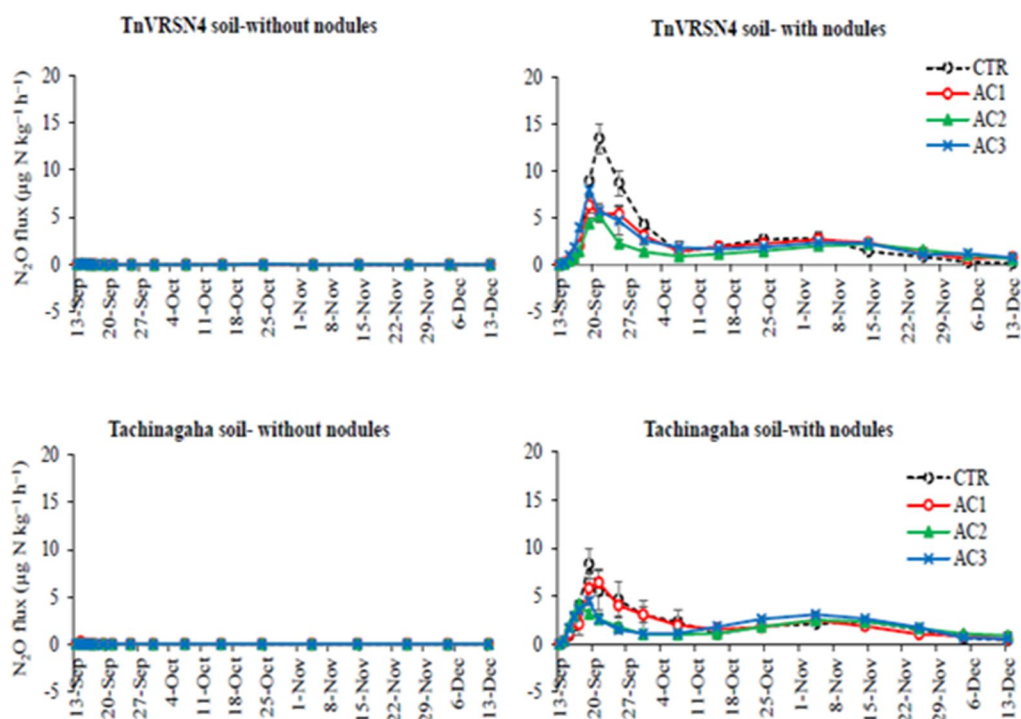


図 4 ダイズ 2 系統から採取した根粒菌から発生する N₂O 放出量と AC による N₂O 放出抑制効果

以上のことから、本研究の 3 つの目的に対して以下のように結論付けた。

(1) AC はダイズ栽培における窒素由来の N₂O 放出に対してそれほど放出低減効果を示さなかったが、根粒菌が多く着生する系統に対しては低減効果を示した。また AC は明らかに根粒着生を阻害させる効果を示した。これは、ダイズの根から滲出するイソフラボン類の AC による吸着が考えられた。

(2) AC は根から滲出する物質を吸着させることから、ダイズの根粒からの窒素源が不足し、子実収量が低下することが考えられた。しかし本研究で根粒菌が着生していなくてもダイズ栽培の慣行肥料を元肥として施肥すれば十分収量が得られることが明らかとなった。これはダイズの連作障害が AC によって軽減でき、子実収量は維持できるという結果を支持するものとなった。

(3) ダイズ子実収穫後の根に着生していた根粒菌の腐敗と伴に発生する N₂O 量を把握し、この N₂O 放出を AC 混和ではほとんど低減できにことが明らかとなった。今後、より低減できる対策案を講じる必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Daniel Basalirwa, Shigeto Sudo, Cosmas Wacal, Caroline Namirembe, Daisuke Sasagawa, Sadahiro Yamamoto, Tsugiyuki Masunaga, Eiji Nishihara	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of activated carbon on greenhouse gas emissions, seed yield, soil chemical properties and isoflavone content of soybean genotypes with varying nodulation capacities under sandy soil conditions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rhizosphere	6. 最初と最後の頁 100202と100207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----