

令和元年6月13日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14838

研究課題名(和文) 近傍植物への傷害刺激によるダイズ根粒着生数増加要因の解明と応用

研究課題名(英文) Application and analysis on increase of nodule number in soybean with injuring stimulus to the neighboring plants

研究代表者

足立 文彦 (ADACHI, fumihiko)

島根大学・学術研究院農生命科学系・助教

研究者番号：10335549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ近傍植物への傷害はその根から発生したガスによりダイズの根粒着生数を有意に増加させた。しかし、雑草土壌浸透水による根粒形成遺伝子の発現には傷害の有無は関係しなかった。一方で雑草が生育した土壌に含まれる雑草産生物質が根粒着生を促進した。ダイズ茎中のゲニステイン減少量(推定放出量)と根粒着生数との間には有意な正の直線的関係が認められた。従って、傷害を受けた雑草からのジャスモン酸を含むガス状物質の影響はあるものの、根粒着生数の増加は、主に雑草の他感物質に反応したダイズイソフラボンの放出量増加を介して生じたものと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイズの根粒着生が他植物から受ける影響を明らかにしたものは少ない。植物の傷害ホルモンであるジャスモン酸が根粒形成に影響することは従来知られていた。しかし、ダイズの根粒着生数の増加が近傍植物の傷害によるものではなく、近傍植物から土壌に放出される他感物質にダイズが反応しイソフラボンを植物体外に放出した結果である可能性を明らかにした点で高い意義がある。すなわち、本研究からは雑草他感物質に反応したダイズのイソフラボン放出反応が、近隣の雑草との競争に負けないよう早急に根粒菌を取り込み生育を加速させるためのダイズの適応プロセスである可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Nodule number of soybean was significantly increased by the gas released from the roots of injured plants close to the soybean. Nodule gene-expression triggered by the water infiltrated from soil planted weed species was not related with injury to the weed. On the other hand, nodulation was accelerated by weed produced substances contained in the weed growing soils. Relationship between genistein loss "estimated genistein discharge" from soybean stem and the nodule number was positively correlated. While the nodulation was influenced by gaseous substances including jasmonic acid produced from injured plants, it was therefore suggested that nodule number was mainly accelerated through the increase of soy isoflavone discharge in response to the weed allelochemicals.

研究分野：作物生産学

キーワード：根粒菌 ダイズ 雑草 ジャスモン酸 イソフラボン Nod遺伝子 アレロパシー 他感物質

1. 研究開始当初の背景

ダイズ栽培において7月の中耕後に畦間雑草を地際で切除(草刈り)した場合に根粒着生数が増加した。一方、ダイズに隣接させてヒエを栽培した場合でも、ヒエ地上部切除区で高い根粒着生数が得られた。すなわち、ダイズ近傍の植物に切除などの傷害刺激を与え、土中に根を残すことでダイズの根粒着生が促進できる可能性がある。これは、根粒菌のリポキチンオリゴ糖(Nod Factor)が傷害を受けた雑草からのジャスモン酸産生の高進によって増加することが原因である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、近傍植物への傷害刺激による根粒着生数の増大は、ジャスモン酸類の放出による根粒形成の促進が原因ではないかと仮説し、ダイズとの近接栽培による根粒着生数調査、被傷害植物からの捕集ガスならびに根圏滲出液による曝露実験と根粒形成関連遺伝子の発現解析等により近傍植物への傷害刺激がダイズの根粒着生数を増加させる要因を解明し、栽培技術として利用する上での可能性と限界を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ジャスモン酸の処理条件がダイズの根粒着生と生育に及ぼす影響

1/5000a ポットに種子リポキシゲナーゼ全欠損ダイズの「すずさやか」とその母本品種である「スズユタカ」を播種し窒素欠如培養液を与えて栽培した。メチルジャスモン酸(MJ)とプロピルジヒドロジャスモン酸(PDJ)を用いてJAの終濃度で0, 20, 40 $\mu\text{M L}^{-1}$ となるよう根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110)液に添加し第1本葉展開期に各株元3cmに1mL散布した。一方、根粒菌接種土壌にPDJのみを0, 20, 40, 80 $\mu\text{M L}^{-1}$ 散布した場合でも比較した。

畑圃場では、慣行栽培した「対照区」、第1本葉展開期に40 $\mu\text{M L}^{-1}$ のPDJを株元に散布する「PDJ本葉区」、PDJと根粒菌液の混和液を種子近傍に散布する「PDJ+根粒菌区」を設けた。翌年は、ダイズの種子近傍にPDJあるいは根粒菌液を散布する「PDJ種子区」と「根粒菌区」を加えて生育と根粒着生数を比較した。

(2) 物理的傷害を受けた近傍雑草がダイズの根粒着生と生育に及ぼす影響

2016年6月初旬に栽培ヒエあるいはメヒシバをプランター当たり発芽数が少・中・多となるよう播種した。7月初旬に直径12.5cmのポットにメッシュをセットし、ダイズを播種した。雑草の地上部を7月中旬に切除した後、ダイズをメッシュごとプランターに埋設した。

一方、島根県松江市の島根大学畑圃場で2016年にダイズ4品種を供試し栽培した。放置区、除草剤散布区(除草剤区)と雑草地上部刈取区(刈取区)を設け、除草剤区はグリホシネートを雑草に散布した。刈取区は雑草が生えてくるたびに根元近くで刈り取った。北海道深川市の畑圃場では島根と同様の処理によりトヨハルカを栽培した。

(3) 給水マット水耕栽培法を用いた雑草産生物質によるダイズ根粒着生促進の評価

2017年6月下旬に育苗箱にメヒシバ、オオバコ、オナモミ、ホソアオゲイトウを播種した。9月中旬に雑草の地上部を刈り取り、育苗箱を2Lの水道水に浸漬し24時間後に水を回収した。供試ダイズ品種は根粒着生系統のフクユタカと非着生系統の九系449を用いた。栽培には肥料養液と根粒菌を 10^7cell L^{-1} の菌密度となるよう各雑草浸透水に添加混合した水耕液を供試し、25人工気象室内で21日間栽培した。

8月初旬にヒエとメヒシバを育苗箱に播種し、9月中旬からダイズの水耕栽培を開始した。供試ダイズ品種は根粒着生系統のフクユタカと非着生系統の九系449を用いた。水道水で作成した水耕液を入れたダイズ栽培コンテナを雑草の育苗箱で覆うことで雑草根圏ガスが水耕液に溶け込むようにしガラス室内で24日間栽培した。また、種間差に加えて雑草地上部を地際約3cmで切除する処理の有無を併せて比較した。対照は無雑草土壌(パーライト)とした。

(4) 雑草産生物質によるダイズの根粒着生促進機作の推定

雑草の地上部を切除した場合としない場合の土壌浸透水、既知促進物質、蒸留水(対照)をそれぞれ根粒菌の培地に添加し、*NodC*遺伝子の発現量をreal-timePCR法により比較した。

ホソアオゲイトウ、オオバコ、オオオナモミ、メヒシバ、ヒエを育苗コンテナに播種し栽培した。育苗コンテナを710mLの蒸留水に44時間浸漬後の雑草水を根粒菌液に1mL添加して培養後、逆転写反応を行い、real-timePCR法によって*NodC*遺伝子の発現解析を行った。

根粒が着生するフクユタカとそれを親とする根粒非着生の九系449を直径12.5cmポットにより赤玉土で栽培した。水深約2cmに水を溜めたトレイ上に同様に雑草を栽培した育苗コンテナを浸漬し、給水紐の片端をトレイに、その一端をダイズの根付近に差し込み雑草水が常時供給できる状態で8月上旬から約31日間栽培した。実験終了後に部位別乾物重と根粒数を測定し、その後茎部のイソフラボン含量をLC/MSにより求めた。

4. 研究成果

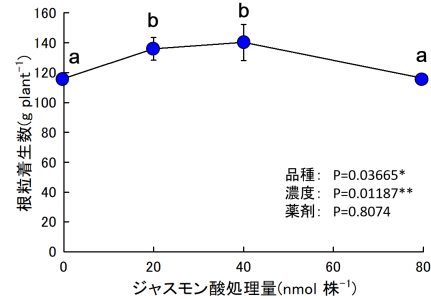
(1) ジャスモン酸の処理条件がダイズの根粒着生と生育に及ぼす影響

ダイズ株元に JA 類と根粒菌の混合液を散布した場合、根粒着生数は MJ に比較して PDJ で有意に増加し、20 μ M で最も高くなった(第1図)。処理による根粒着生の向上は窒素含量と乾物重を増加させた。一方、PDJ を土壤に散布した場合は、20、40 μ M で有意に根粒着生数が高くなったものの乾物重に差はなかった。そこで、PDJ が乾物重に及ぼす直接の影響を比較すると、根粒着生系統では変化がなかったのに対して、非着生系統では PDJ 濃度の増加にともなって減少した

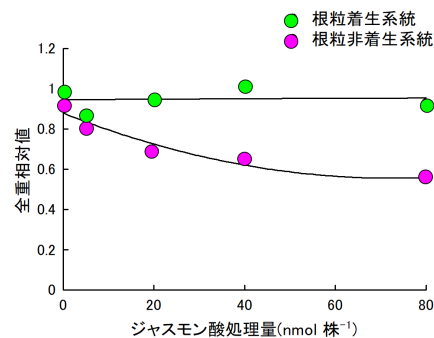
(第2図)。従って、PDJ 処理は根粒着生を促進するものの、ダイズの生育を抑制するために乾物重が増加しなかったものと考えられた。

圃場条件では、PDJ+根粒菌区だけが根粒着生数を有意に増加させた。根粒菌区の着生数は対照区と同程度であったことから、PDJ により根粒着生が促進されたものとみなされた。

以上から、ダイズ根粒着生の促進には、根粒菌液と PDJ を終濃度 20 μ M L⁻¹ となるよう添加した混合液を第1本葉展開期頃に株元散布するのが効果的であり、畑条件でも混合液の種子近傍散布により根粒着生を促進できた。ただし、ジャスモン酸は処理濃度によって根粒着生促進とダイズ生育抑制の双方に影響することから相互作用の評価と慎重な利用が必要と考えられた。



第1図 ジャスモン酸処理量と根粒着生数との関係



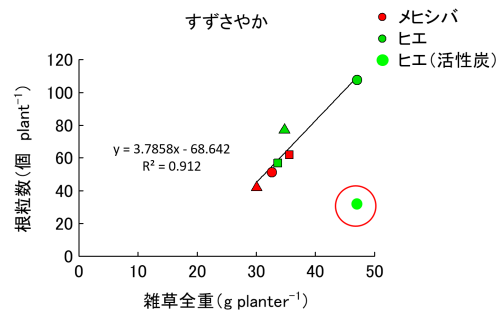
第2図 PDJ を土壤に処理した場合の各系統の Onmo l 株⁻¹の乾物重を1とするダイズ全重相対値

(2) 物理的傷害を受けた近傍雑草がダイズの根粒着生と生育に及ぼす影響

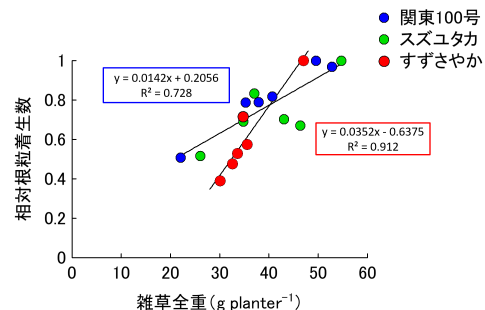
地上部切除処理時の雑草全重とダイズの根粒着生数との関係は、ダイズの品種毎に雑草種を込みにした一つの正の一次直線で表すことができた。ただし、活性炭により土壤水分を吸着させた場合には根粒着生数が著しく減少した。従って、根粒着生数は雑草根系からの物質によって影響されていることが確認できた(第3図)。根粒着生数を各品種の最大根粒着生数を1として相対化し、雑草全重との関係を求めると、両者の関係の近似線は「すずさやか」で最も大きくなった(第4図)。従って、雑草が生育する土壤水は根粒着生促進物質を含有し、雑草量が多いほど根粒の着生が促進される濃度依存的な反応を示し、ダイズ感受性には品種間差があると考えられた。

圃場条件下では、除草剤区と比較して雑草地上部を切除した場合には根粒着生数が増加する傾向にあった。寒地の北海道において、雑草管理方法を変えてダイズを栽培した場合の根粒着生数を比較すると、7月下旬では除草剤や手取除草に比較して、地上部刈取り、放置した場合に着生数が増加し、8月下旬には刈取区の根粒数が著しく有意に増加した。

以上から、雑草に近接して栽培したダイズの根粒着生は、雑草現存量の増加によって促進され、雑草種間差はそれにより説明できた。種子リポキシゲナーゼ欠損系統ダイズは強く影響を受けた。一方、圃場条件下では特に根粒形成が困難な冷涼地域で根粒着生数の促進が見られたため、実際の栽培技術としての利用が期待される。



第3図 雑草全重と根粒着生数との関係(すずさやか)



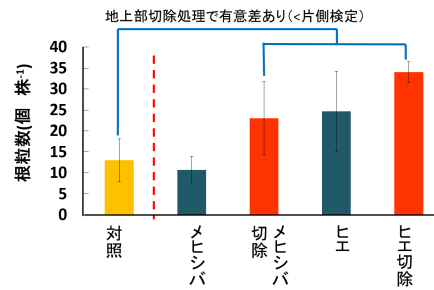
第4図 雑草全重と各品種の最大根粒着生数を1とする相対根粒着生数との関係

(3) 給水マット水耕栽培法を用いた雑草根産生物質によるダイズ根粒着生促進の評価

4種の雑草栽培土壌の浸透水を水耕液に用いた場合、無雑草土壌水（対照）と比較してメヒシバで根粒着生数と根粒重が、オオバコで根粒重が有意に増加した。供試土壌浸透水の成分分析を行うと雑草土壌浸透水に施肥成分はほとんどないとみなされた。従って、メヒシバとオオバコの根粒着生数の増進は雑草土壌浸透水の含有物質によるものと考えられた。

雑草根圏ガスを給水マット水耕栽培の水耕液に常時曝露させて栽培した場合、地上部切除により5%水準で有意に根粒着生数が増加し、雑草根から放出される気体が根粒着生に影響する可能性が示唆された（第5図）。

以上から、雑草土壌浸透水の根粒着生促進効果には雑草種間差があった。ただし、促進物質には液体だけでなく切除によって生じるジャスモン酸などの気体が含まれることが確認されたため、当初の仮説以外に雑草から産生される複数の物質が根粒着生を促進している可能性が考えられた。



第5図 雑草根圏ガスに曝露した水耕液で栽培したダイズの根粒着生数

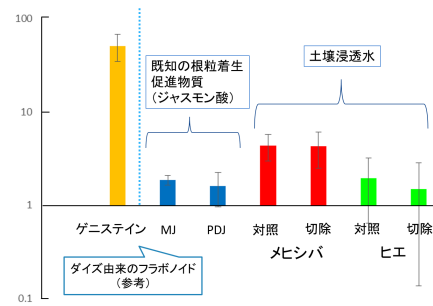
(4) 雑草産生物質によるダイズの根粒着生促進機作の推定

雑草地上部の切除の有無の処理をした土壌浸透水を根粒菌液に添加した時の根粒菌 *NodC* 遺伝子の相対発現量は、地上部切除による物理的傷害の影響を受けなかった（第6図）。一方、雑草土壌水はジャスモン酸類よりも発現を促進したことから、常時雑草から産生されているジャスモン酸以外の物質が根粒着生の促進に強く影響している可能性が高いと考えられた。

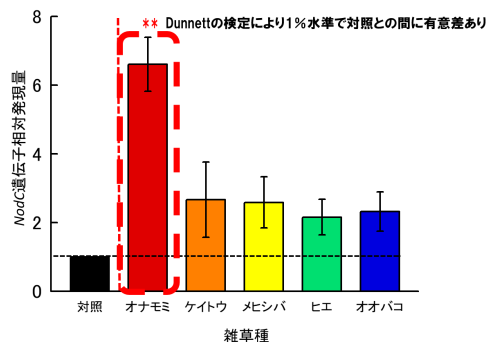
NodC 遺伝子の発現量を雑草間で比較すると、オナモミは有意に発現が増加したのに対して、それ以外の雑草では対照（水）との間に有意差は認められなかった（第7図）。従って、オナモミは根粒菌の根粒形成関連遺伝子に直接働きかけ、*Nod* 因子の産生を増加させる可能性があることが考えられた。

一方、雑草水を常時供給したダイズの生育は、根粒非着生品種では処理した雑草種間で有意差が認められなかったのに対して、着生品種はホソアオゲイトウとオナモミで根粒数が多く（第8図）、全重に有意差が生じたことから、生育量の差は根粒着生を介した影響とみなされた。そこで、ダイズ茎中のイソフラボンの一つであるゲニステインの減少量（対照に対する較差）と根粒着生数との関係を求めると、両者の間には有意な正の直線的関係が認められた。従って、ダイズが雑草水に反応した結果、植物体からのゲニステイン放出量に差が生じ、それに応じて根粒形成が生じたものと考えられた。この間接的な作用は幅広い種で根粒着生の促進に働くしくみである可能性がある。ただし、オナモミの雑草水は根粒菌の根粒形成関連遺伝子に直接作用した。従って、雑草種による強弱があるものの、その産生物質は根粒菌に対する直接・間接の両方の働きかけにより根粒着生を促進するものと考えられた。

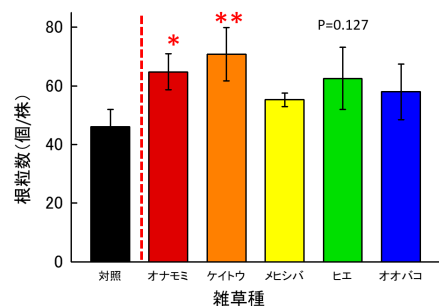
以上から、ダイズ近傍植物への傷害は根から生じるガスによりダイズの根粒着生数を有意に増加させた。しかし、雑草土壌浸透水による根粒形成遺伝子の発現には傷害の有無は関係しなかった。一方で雑草が生育した土壌に含まれる雑草産生物質が根粒着生を促進した。ダイズ茎中のゲニステイン減少量（推定放出量）と根粒着生数との間には有意な正の直線的関係が認められたことから、傷害を受けた雑草からのジャスモン酸を含む気体の影響はあるものの、根粒着生数の増加は主に雑草の他感物質に応答したダイズイソフラボンの放出量増加を介して生じているものと示唆された。



第6図 雑草地上部切除による *NodC* 遺伝子の相対発現量



第7図 異なる雑草水による *NodC* 遺伝子の相対発現量



第8図 異なる雑草水を常時供給した時の根粒着生数

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

1 . 足立文彦・楨藍子・秋山浩輝・穂本沙織・城 惣吉・大道雅之 . 近傍雑草がダイズの根粒着生に及ぼす影響 . 第 246 回日本作物学会講演会 . 2018 .

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 大道 雅之

ローマ字氏名 : (OMICHI, masayuki)

所属研究機関名 : 拓殖大学北海道短期大学

部局名 : 農学ビジネス学科

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 20461692

研究分担者氏名 : 城 惣吉

ローマ字氏名 : (SHIRO, soukichi)

所属研究機関名 : 島根大学

部局名 : 学術研究院農生命科学系

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 20721898

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 .