

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580023

研究課題名(和文)ダイズ種子への微生物塗布による湿害回避技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of excess-moisture injury avoidance techniques by microorganisms application to soybean seeds

研究代表者

山口 武視 (YAMAGUCHI, TAKESHI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30182447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ根圏からIAA生産能の高い細菌を単離し、2菌株を選抜した。この2菌株はマイクロバクテリウム属とクロノバクタ-属と同定された。

これら2菌株の懸濁液を播種直前にダイズ種子に塗布(5分間浸漬)し、圃場に播種した。両菌とも出芽率に悪影響は与えないことが確認され、マイクロバクテリウム属塗布の収量は対照に比べて、エンレイで46%、サチユタカで16%の増収した。一方、クロノバクタ-属は減収となった。微生物の種子塗布という簡単な処理で、ダイズの収量を向上させる効果があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Two bacteria of high IAA production activity had been isolated from soybean rhizosphere. One was identified as Microbacterium genus, the other was identified as Cronobacter genus. These two bacteria suspension coated (soaked for 5 minutes) to the seed just before the soybean two variety seeds (Enrei and Sachiutaka), there were sown in the field.

Both bacteria were confirmed that not give bad influence to the emergence rate. The yield of soybean coated with Microbacterium genus as compared to the control, increased 46% in Enrei and 16% in Sachiutaka, respectively. On the other hand, the yield of soybean coated with Cronobacter genus were reduced. It is a simple method of coating the microorganisms to the seed, but it was revealed that the effect of increasing the yield of soybean.

研究分野：作物学

キーワード：ダイズ 植物生育促進根圏細菌 湿害 根長 種子塗布

1. 研究開始当初の背景

日本のダイズ作は水田転換畑への作付けが全作付面積の75%以上に達している。このため、高い地下水位と排水不良による湿害が、収量向上の阻害要因のひとつとなっている。

この湿害発生には、低酸素、高二酸化炭素だけではなく、土壌有機物の多少、病原菌増殖の有無、根粒菌活性の多少など複数要因が複雑に絡みあっているために湿害回避策がなかなか見いだせていない。湿害回避の方向性としては、耐湿性品種の選抜または品種改良、栽培法の改善、の両面からのアプローチが求められている。しかし、耐湿性品種の選抜または品種改良については、品種間差異の再現性がない、生育ステージにより反応が異なる、など一定の成果が得られていない。一方、栽培法の改善では、中耕培土や耕起方法の改善などいくつかの有効な手段が提案されているが、省力化・低コスト化が望まれている現場では、さらなる技術開発が求められている。

申請者は、湿害を軽減するためには耐湿性品種を用いるよりも根の活力を高く保つ栽培管理技術を適用することの方が重要であることを指摘した(山口ら 2005; 日作紀 74 別 2: 138-139)。この根の活力には根の生理活性と根量の2要因が関わっており、ダイズでは根量が強く関与することも申請者はすでに明らかにしている(馬ら 2005; 根の研究 14: 3-8)。

そこで、根の活力、特に根量を増大させる方策として、根の伸長に直接的、間接的に作用すると思われる植物生育促進根圏細菌の活用に着目した。根粒菌でない微生物の力を借りて根の活力向上を図ろうと考えた。

2. 研究の目的

本課題では、根圏微生物を活用して、根の活力の要因である根量を増大させることで、湿害抵抗性を強化して収量向上を目指すことを上位目標としている。

そのためには、

- (1) 土壌の嫌気条件下でダイズ根を増大させる植物生育促進根圏細菌を探索すること、
- (2) それを用いて圃場レベルで根の活力を増大させることが出来るかどうかを検証すること、

このふたつが本課題の目的である。

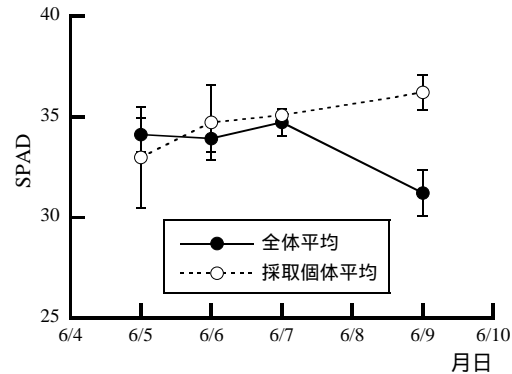
3. 研究の方法

(1) 植物生育促進根圏細菌の探索

ポット栽培：鳥取県のダイズ奨励品種サチユタカを、鳥取大学附属フィールドサイエンスセンター畑土壌を充填した1/5000aワグネルポットに播種し、グロスチャンパー内で生育させた。2012年12月4日に播種し、播種後24日に湛水処理を開始し、処理後18日の個体の根に付着する根圏微生物を採取した。

圃場栽培：同センター畑圃場に1.2m×

4.6mの畝を作り、耕うん後、周囲を波あぜで囲い区画内に水が溜まるようにした。2013年5月14日にサチユタカを播種し、20日間慣行栽培を行った後、7日間常時湛水状態とした。調査対象の25個体について、本葉の葉色をSPADで測定し、これと外観の様子から、湿害程度が軽微な3個体を掘り上げ、根圏微生物の採取個体とした(第1図)。



第1図 湛水処理による葉色の変化

根圏微生物の選抜：主根の根圏より単離した微生物について、植物根の生長と関係の深い天然オーキシンであるIAAの生産能を測定した。IAAの測定は、迅速な測定が可能なサルコフスキー反応による比色定量法を用いて行い、吸光度が選抜基準値(0.3)以上のものをIAA生産能の高い微生物と判断した。

その後、選抜した菌株がダイズ根の生長を促進するのを確認するために、ダイズ種子に菌株を塗布し、無菌条件下の寒天培地で栽培ができる簡易根長測定法(山口ら 2007; 日作紀 76 別 1: 98-99)を用いて、播種5日後の根長と根の太さを記録した。

(2) 植物生育促進根圏細菌の種子塗布がダイズの生育と収量に及ぼす影響

本課題開始後に探索した根長促進効果を有すると思われる2つの菌、*Microbacterium azadirachtae* (以下菌 97) と *Cronobacter sakazakii* (以下菌 193) を用いた。これらの菌は2013年に圃場栽培のダイズ根圏から天然オーキシンであるIAA生産能の高いものを単離、選抜した細菌である。菌 97は簡易根長測定法によって根長促進効果が確認されたもので、菌 193は根の太さの増大が確認されたものである。

播種前日に菌培養液を遠心分離した後、吸光度 $OD_{660}=0.5$ になるまで滅菌水で希釈して菌懸濁液を作成した。対照として蒸留水(以下対照と表記)市販の微生物発酵有機物(商品名：ネバルくん/ファイトクローム、以下有機物と表記)を設定した。ダイズの供試品種は、以前鳥取県の奨励品種であったエンレイ(IIc)と現奨励品種であるサチユタカ(IIIc)の2品種を用いた。

栽培は鳥取大学農学部附属フィールドサイエンスセンター畑圃場で、無施肥・無農薬の慣行栽培を行った。栽植密度は $70 \times 18\text{cm}$ (7.9株/ m^2)で、2品種4処理3反復の計24

区を設置した。

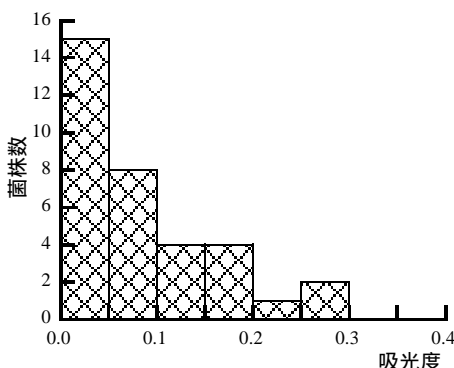
播種直前にダイズ種子を前述の塗布材に各5分間浸漬した。2014年6月26日に1穴2粒ずつ播種し、不織布で覆った。7月8日に不織布を取り除き、同月17日に間引き、25日に中耕培土をした。

塗布材による影響を調査するため、出芽率調査、開花期の葉齢調査を行い、栄養成長期、生殖成長期、収穫期に株全体を掘り上げ、葉面積と乾物重を測定した。収穫期には中庸な2株について収量および収量構成要素を調査した。

4. 研究成果

(1) ポット栽培ダイズ根圏からの植物生育促進根圏細菌の探索結果

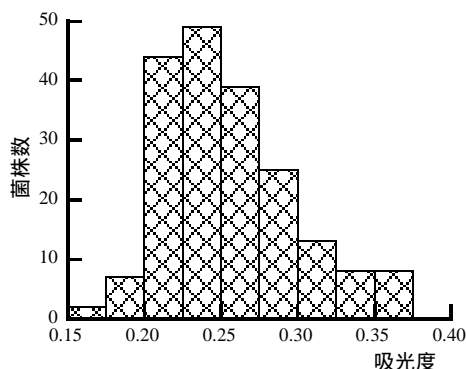
ポット栽培したダイズ根圏から34菌株を単離したが、IAAの吸光度が選抜基準値0.3以上の菌株は1菌株も確認できなかった(第2図)。



第2図 ポット栽培より単離した菌株における530nm吸光度の度数分布

(2) 圃場栽培ダイズ根圏からの植物生育促進根圏細菌の探索結果

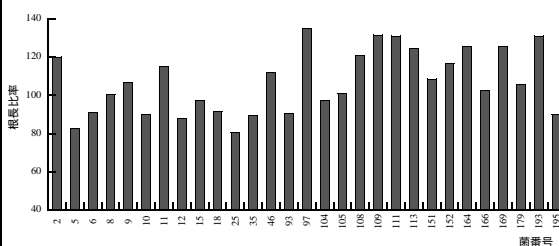
圃場栽培のダイズ根圏から単離した195菌株についてIAA生産能を測定したところ、29菌株が選抜基準値以上の値を示した(第3図)。



第3図 圃場栽培より単離した菌株における530nm吸光度の度数分布

これら29菌株について、簡易根長測定法でそれぞれ根長促進効果を確認した結果、無処理区に対して根長は29菌株平均で6.9%伸長した。無処理区よりも根長が促進されたものは11菌株あり、そのうち菌97を塗布した

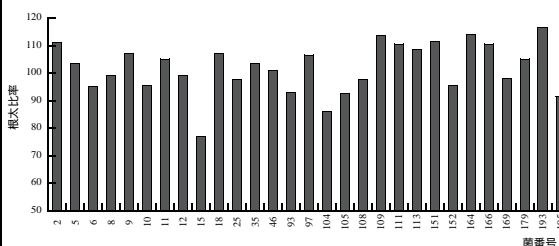
根長は無処理区より35%増大し、5%水準で有意な差が認められた(第4図)。



第4図 吸光度が530nm以上の菌株における平均を100としたときの根長比率

菌97は*Microbacterium azadirachtae*の16SrDNA塩基配列と100%の相同性を示した。この菌は、放線菌に分類され土壌中に自然に生息しており、圃場試験で効果が確認されれば、実用化への期待がもてる。加えて、抗生物質を生産するという特性も栽培に役立つと思われる。なお同定した時点では本菌株と*Bacillus*属とコンタミネーションを起こしていた。後にシングルコロニー化作業を行い、簡易根長測定法で根長を測定した結果、菌97の*Microbacterium azadirachtae*は対照と比較し30%伸長したのに対し、*Bacillus*属微生物はダイズ根の伸長を阻害することが分かった。

湿害を回避するための根の伸長促進には、根長の他に根の太さの増大も重要な要素である。根の太さに関しては、菌株塗布による増大率は29菌株平均で1.9%にとどまったが、菌193が2回の測定で平均16.5%の増大を示した(第5図)。この菌株は根長でも平均31%増大しており、ダイズ根の生長を促進する有益な微生物と判断した。



第5図 吸光度が530nm以上の菌株における平均を100としたときの根太比率

菌193は、*Cronobacter sakazakii*の16SrDNA塩基配列と100%の相同性を示した。本菌は腸内細菌科の嫌気性桿菌で、ヒトや動物の腸管および自然環境下に広く分布するが、乳幼児および高齢者には感染する恐れがあるとの報告もあるので取扱には注意が必要である。

2菌株について、圃場条件下でのダイズ種子に塗布し、根長と収量を調査し、実用性を検討することとした。

(3) 植物生育促進根圏細菌の種子塗布がダ

イズの生育と収量に及ぼす影響

菌塗布が出芽率に及ぼす影響

菌 193 の処理区は対照および有機物処理区に比べて出芽率が有意に高かった。両品種とも対照に比べて、菌 193 次いで菌 97 の出芽率が高い傾向にあった。

このことより、菌 97 および菌 193 の菌株塗布は出芽率に悪影響を与えないことが確認された。

第1表 菌の種子塗布が出芽率に及ぼす影響

品種	処理	出芽率 (%)		欠株率 (%)
		個体	株	
エンレイ	対照	62 b	40 b	11 a
	有機物	62 b	39 b	22 a
	菌97	72 ab	47 b	9 a
	菌193	94 a	77 a	6 a
サチユタカ	対照	77 a	54 a	7 b
	有機物	70 a	44 a	37 a
	菌97	83 a	56 a	11 b
	菌193	88 a	64 a	11 b

各品種間で異なる符号は5%水準で有意差あり (Tukey検定)

菌塗布が成育と収量に及ぼす影響

収量が最も多収であったのは、サチユタカ菌 97 区の 318 g/m² で、次いでサチユタカ対照区の 273 g/m² であった。最も低収であったのは、エンレイ有機物区の 84 g/m² であった。サチユタカにおいて、菌 97 区と有機物区の間で 5%水準で有意差が認められた。品種間で平均収量を比較すると、サチユタカの方が 138 g/m² 多収となった。菌 97 区の収量は対照に比べて、エンレイで 46%、サチユタカで 16%の増収となった。

第2表 収量と収量構成要素

品種	処理	節数 節/m ²	節あたり		莢あたり		成熟 粒数	百粒重 g	収量	
			莢数 莢/節	粒/莢	粒/莢	%			g/m ²	比率
エンレイ	対照	304 a	2.5 a	0.47 a	66	32 a	112 a	100		
	有機物	403 a	2.0 a	0.41 a	49	27 b	84 a	75		
	菌97	325 a	2.6 a	0.61 a	73	33 a	162 a	146		
	菌193	267 a	2.5 a	0.41 a	67	31 ab	89 a	80		
	平均	325	2.4	0.47	64	31	112			
サチユタカ	対照	294 a	3.3 a	0.85 a	86	34 a	273 ab	100		
	有機物	337 a	3.2 a	0.42 a	67	34 a	151 b	55		
	菌97	337 a	3.6 a	0.72 a	84	36 a	318 a	116		
	菌193	320 a	3.7 a	0.66 a	80	34 a	260 ab	95		
	平均	322	3.4	0.66	79	35	250			

各品種間で異なる符号は5%水準で有意差あり (Tukey検定)

エンレイの菌 97 区が増収となった要因は、節数を除く収量構成要素が他の処理よりも高い傾向を示したことにあったと考えられた。個々の要素では処理区間で有意な増加は確認できないが、各要素が相乗することで、増収傾向を示したと考えられた。

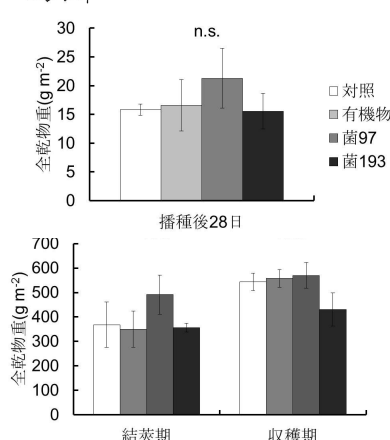
ここで、対照区の値と比較して最も開きが大きい莢あたり粒数について見ていきたい。莢あたり粒数は莢胚珠数と稔実歩合を掛けたもので、莢形成や子実を充実させるためには多くの光合成産物の供給が必要とされる。そこでこれを確認するために、第6図にエンレイの全乾物重の推移を示したが、菌 97 区は常に高い乾物重を維持していたことが確認された。

サチユタカの菌 97 区が増収となった要因は、莢あたり粒数以外の収量構成要素が対照区

と比べて高い傾向を示したことにあったと考えられた。対照区の値と比較して最も開きが大きい構成要素は面積当たり節数であった。

節数は栽植密度による変動が大きいが、本試験では全区 7.9 株/m² で同じである。そこで、他の構成要素である百粒重と面積当たり粒数について着目すると、サチユタカの菌 97 区は他の処理よりも約 2g 重く、面積当たり莢数と粒数は他の処理よりも増加する傾向が確認された。ダイズの収量は百粒重と面積当たり粒数のかけ算で求めることができることから、これらの増加が収量の増大に影響したのではないかと考えられた。特に、百粒重の増加の原因については、第3表に示した結莢期から収穫期にかけての地上部重の減少率が低い値を示したことに着目した。つまり、生育後期まで葉が落葉せず、光合成活性が維持され、長期間光合成産物が子実に供給されたことで百粒重が増大したと推察された。

エンレイ



第6図 エンレイにおける各生育時期の全乾物重

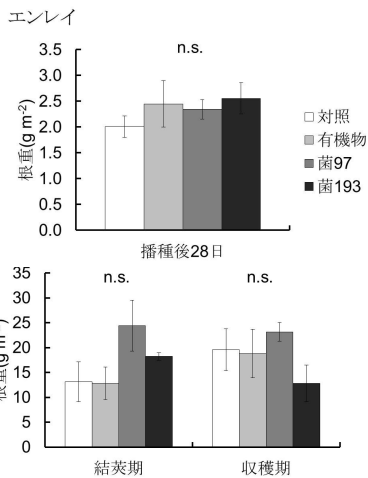
第3表 サチユタカの地上部重 (g/plant) と期間減少率

処理	結莢期	収穫期	減少率 (%)
対照	109 a	84 a	23.1
有機物	114 a	97 a	15.0
菌97	105 a	104 a	0.5
菌193	95 a	91 a	4.2

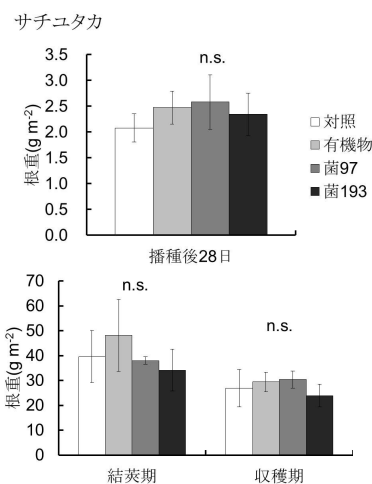
菌 193 区の減収要因については、エンレイでは収量構成要素の全てが対照区を下回る傾向を示したことにあった。サチユタカでは面積当たり節数と節あたり莢数は、対照区を上回る傾向を示したものの、莢あたり粒数が大きく下回る傾向を示した。

ここで、菌塗布が地下部に及ぼす影響について検討しておきたい。地下部の形質として、根重および T/R 比に着目した。

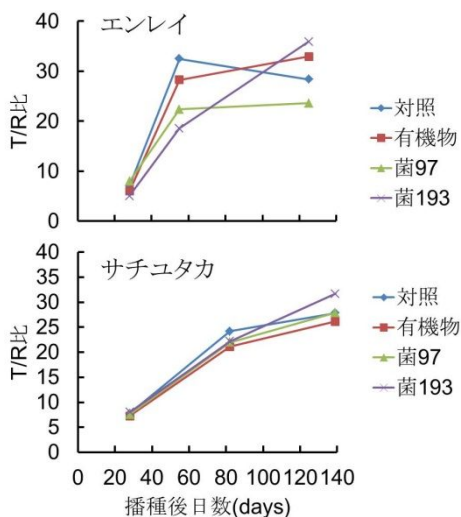
まず根重の推移(第6図、第7図)では、菌 193 区では、播種後 28 日では対照区よりも重い傾向を示したが、収穫期になると、どの処



第6図 エンレイにおける各生育時期の根重



第7図 サチユタカにおける各生育時期の根重



第8図 両品種の T/R 比の推移

理よりも下回る傾向が確認された。サチユタカの根重についても同様の結果が得られ、菌193区はいずれの時期も低い傾向を示した。一方、菌97区の根重はエンレイでは結莢期および収穫期で他の区よりも高い値を示し、

サチユタカでは特徴的傾向は見られなかった。

この根重の推移を受けて、T/R比の推移(第8図)を見ると、サチユタカでは区間に差は認められず、エンレイにおいては、収穫期の菌193区のT/R比が高い増加率を示した。

以上より、菌97については根への伸長効果は明確ではないが、種子塗布という簡単な処理で、ダイズの収量を向上させる効果があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

山口武視・駒居良紀・井口知子・会見忠則・辻 渉・中田 昇・近藤謙介・野波和好(2014)ダイズにおける湿害回避のための根長促進根圏細菌の探索・農業生産技術管理学会誌第21巻別冊1:29-30(査読なし)

〔学会発表〕(計1件)

山口武視・駒居良紀・井口知子・会見忠則・辻 渉・中田 昇・近藤謙介・野波和好(2014)ダイズにおける湿害回避のための根長促進根圏細菌の探索・農業生産技術管理学会平成26年度大会、2014年9月12日、玉川大学(東京町田市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 武視 (YAMAGUCHI TAKESHI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号： : 3 0 1 8 2 4 4 7